



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FISIOTERAPIA**

VANDENI CLARICE KUNZ

**MODULAÇÃO AUTONÔMICA DA FREQUÊNCIA CARDÍACA E SUA
RELAÇÃO COM OS FATORES DE RISCO E O POLIMORFISMO DO
GENE DA ECA DE PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL
CORONARIANA**

SÃO CARLOS

2012

VANDENI CLARICE KUNZ

**MODULAÇÃO AUTONÔMICA DA FREQUÊNCIA CARDÍACA E SUA
RELAÇÃO COM OS FATORES DE RISCO E O POLIMORFISMO DO
GENE DA ECA DE PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL
CORONARIANA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Fisioterapia, área de concentração: Processos de Avaliação e Intervenção em Fisioterapia.

Orientadora: Profa. Dra. Ester da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Rozangela Verlengia

SÃO CARLOS

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

K96ma

Kunz, Vandeni Clarice.

Modulação autonômica da frequência cardíaca e sua relação com os fatores de risco e o polimorfismo do gene da ECA de pacientes com doença arterial coronariana / Vandeni Clarice Kunz. -- São Carlos : UFSCar, 2012. 146 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Fisioterapia. 2. Frequência cardíaca. 3. Doença arterial coronariana. 4. Polimorfismo (Genética). 5. Sistema nervoso autônomo. 6. Dinâmica não-linear. I. Título.

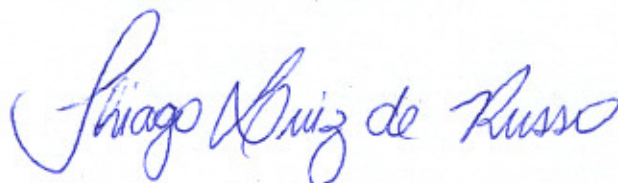
CDD: 615.82 (20^a)

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da banca examinadora para defesa de tese de doutorado de Vandeni Clarice Kunz, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, em 16 de fevereiro de 2012

Banca Examinadora:


Prof.ª Dr.ª Ester da Silva
(UFSCar)



Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo
(UFSCar)


Prof. Dr. Rodrigo Gonçalves Dias
(HCFMUSP)


Prof. Dr. Luiz Carlos Marques Vanderlei
(UNESP)


Prof. Dr. Robison José Quitério
(UNESP)

VANDENI CLARICE KUNZ

PRIMEIRO MANUSCRITO

Análise linear e não linear da variabilidade da frequência cardíaca de homens saudáveis e de pacientes após infarto do miocárdio

Linear and nonlinear analysis of heart rate variability in healthy subjects and post acute myocardial infarction patients

SEGUNDO MANUSCRITO

Relação entre a modulação autonômica cardíaca e as características clínicas e angiográficas de pacientes com doença arterial coronariana

The relationship between cardiac autonomic function and clinical and angiographic characteristics in patients with coronary artery disease

TERCEIRO MANUSCRITO

O polimorfismo I/D do gene da ECA não influencia a modulação autonômica da frequência cardíaca de pacientes com doença coronariana

I/D polymorphism of the ACE gene does not influence autonomic modulation of heart rate in patients with coronary disease

Orientadora: Profa. Dra. Ester da Silva

Co-Orientadora: Profa. Dra. Rozangela Verlengia

SÃO CARLOS

2012

Investigação conduzida no Laboratório de Pesquisa em Fisioterapia Cardiovascular e de Provas Funcionais e no Laboratório de Performance Humana da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Metodista de Piracicaba, com apoio financeiro do CNPq (Processo 478601/2010-7, Edital Universal; Processo 308348/2009-5, Bolsa Produtividade; e Processo 579408/2008-6, Bolsa de Doutorado).

“Porque os meus pensamentos não são os vossos pensamentos, nem os vossos caminhos, os meus caminhos, diz o Senhor, porque, assim como os céus são mais altos do que a terra, assim são os meus caminhos mais altos do que os vossos caminhos, e os meus pensamentos, mais altos do que os vossos pensamentos”. Isaías 55:8-9

“Combati o bom combate, completei a carreira, guardei a fé”. II Timóteo 4:7

Dedicatória

Dedico esse trabalho a pessoas especiais:

Meus pais, Pedro e Laci Kunz, pela importância que têm em minha vida.

À orientadora e amiga, Profa. Dra. Ester pela imensa contribuição na formação da minha carreira profissional, pela orientação segura e atenciosa.

Ao meu marido Cleiton, pela dedicação, compreensão e bom humor que contribuíram em vários momentos desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradecer é um gesto mínimo de reconhecimento perante a intensidade do carinho e da gratidão que sinto por todos aqueles que participaram de alguma forma desse trabalho.

Agradeço a Deus, criador e mantenedor da minha vida;

Aos meus pais Pedro e Laci, aos meus irmãos Vilson e Vanice e familiares: Jair, Leani, Andrey, Guilherme e Letícia, pelo amor, carinho, apoio e incentivo;

Ao meu marido Cleiton (Amadinho), ou carinhosamente chamado de Nego, pela alegria, paciência, amor, dedicação e pela compreensão nos momentos de ausência. Ter você como marido e companheiro me faz mais feliz;

À orientadora, amiga e mentora, Profa Dra Ester da Silva, não tenho palavras para agradecer por todo conhecimento, ensinamento, paciência e orientação prestados durante todos esses anos. Obrigada pelo constante estímulo e irrestrita confiança que tem sempre depositado sobre mim, o que me deixa honrada e me enche de responsabilidade. Obrigada também pelo carinho como amiga e conselheira;

À Profa Rozangela Verlengia, co-orientadora desse trabalho, obrigada por me ensinar e auxiliar nos experimentos da área da biologia molecular, pelo incentivo e apoio;

À amiga Ana Cristina Silva Rebelo, pela amizade, pelo carinho imenso, por toda a ajuda, compreensão, incentivo e alegria. Obrigada por nossa amizade e pelo companherismo de trabalho durante todos esses anos;

Aos amigos que já passaram ou que continuam no Laboratório: Mariana Salviati, Tarcisio Nery, Nayara Tamburus, Roberta de Paula Lopes, Antonio Roberto Zammuner, Daiane Christofoleti, Raquel Bressan, Tais Camargo, Karina Serra, Erica Borges, Roberta Zuttin, Thamires Zanin, Vanessa Celante, Marina Crepaldi, Marco Antonio Cordeiro, Emilia Balthazar, Carolina P. Andrade e Meire Forti, obrigada pela contribuição científica, pelos trabalhos realizados em conjunto, pela amizade e pelos momentos de apoio e alegria;

Ao Dr Marcelo de Castro César, pela participação nas avaliações dos pacientes;

Aos médicos Dr. Eduardo Nicolela Jr. e Dr. Humberto Margno Passos e às enfermeiras Priscila e Marina e a todos os funcionários do Centro de Hemodinâmica (Emcor) da Santa Casa de Misericórdia de Piracicaba, por permitirem a triagem dos pacientes com doença arterial coronariana;

Aos médicos Dr. Paulo Serra e Luiz Antonio Gubolino, aos funcionários da Unidade Coronariana do Hospital dos Fornecedores de Cana de Piracicaba, pelo auxílio na triagem e encaminhamento de pacientes com infarto agudo do miocárdio;

Aos pacientes, pela disposição e confiança;

Aos amigos e professores da Universidade Metodista de Piracicaba, pelo apoio e incentivo;

Aos amigos e professores da Universidade Federal de São Carlos, em especial a Profa Catai e a Profa Anielle pelo auxílio e amizade;

Ao CNPq pelo apoio financeiro o que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho;

Obrigada a banca de qualificação e avaliação final, pela nobre leitura do trabalho;

Aos amigos da Igreja Adventista do Sétimo Dia, agradeço pelas orações, pelos momentos de alegria e por me ajudar na caminhada de fé;

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a minha formação profissional e pessoal, durante todo esse período.

RESUMO

A doença arterial coronariana (DAC) é de natureza multifatorial sendo que as principais complicações estão relacionadas à angina e infarto agudo do miocárdio (IAM), apresentando disfunção da modulação autonômica cardíaca simpática e parassimpática. Assim, o objetivo foi avaliar a modulação autonômica da frequência cardíaca (FC), a partir de métodos lineares e não lineares, de homens saudáveis, de pacientes com IAM e com diferentes percentuais de estenose coronariana e sua relação com os fatores de risco para a DAC. Para a análise da variabilidade da FC (VFC) foi realizada a captação dos intervalos RR e da FC, durante 15 min na posição supina. A partir dos resultados do estudo foram elaborados três manuscritos.

Primeiro manuscrito: Foram apresentados os resultados de 10 homens com IAM (57±9 anos) (avaliados no 2º e 7º dia após evento coronariano) e 11 homens saudáveis (53±4 anos). A análise da VFC foi realizada utilizando-se dos métodos lineares no domínio do tempo (DT=RMSSD e RMSM) e da frequência (DF=baixa frequência (BF) e alta frequência (AF) em unidades normalizadas (un) e BF/AF) e pelo método não linear de entropia aproximada (EnAp). As análises da relação entre os métodos lineares e o não linear (índices RMSSD, RMSM, BFun, AFun e BF/AF com a EnAp) foi significativa. Os índices lineares e não linear da VFC do grupo saudável foram maiores em relação ao grupo IAM no 2º e no 7º dia. Os resultados mostram que os métodos lineares no DT e no DF e o não linear, são concordantes, para análise da VFC, tanto para voluntários saudáveis como para pacientes após o IAM.

Segundo manuscrito: Foram apresentados os resultados de 52 homens (54±5 anos) divididos em três grupos, sendo dois grupos com obstrução coronariana DAC+ (≥ 50%; n=18) e DAC- (< 50%; n=17) e um grupo controle (n=17). A análise da VFC foi pela entropia de Shannon (ES) e análise simbólica (0V e 2ULV). Os pacientes com DAC+ apresentam menor ES (complexidade) e 2ULV (predominância vagal) e maior 0V (predominância simpática) quando comparado aos grupos DAC- e controle, o que indica que a disfunção autonômica cardíaca está relacionada ao grau de oclusão coronariana.

Terceiro manuscrito: Foram apresentados os resultados da possível relação existente entre dos fatores de risco, do polimorfismo I/D do gene da ECA com os índices no DT e no DF de 151 pacientes com DAC (56±8 anos, DD=54, DI=70 e II=27). Os resultados mostram que não há relação entre o polimorfismo I/D do gene da ECA com a FC, PA e VFC. Já os maiores índices da VFC que refletem a modulação autonômica vagal estão relacionados ao menor percentual de estenose e ao uso de inibidores da ECA.

Descritores: Frequência cardíaca; Doença coronariana; Polimorfismo genético; Sistema nervoso autônomo; Dinâmica não linear; Enzima conversora de angiotensina.

ABSTRACT

The multifactorial nature of coronary artery disease (CAD) includes complications related to angina and acute myocardial infarction (AMI) and disorders involving sympathetic and parasympathetic cardiac autonomic modulation. The objective of this study was to evaluate the autonomic modulation of heart rate (HR) by linear and non-linear methods in healthy men and in patients with AMI and different percentages of coronary stenosis, as well as its relation with CAD risk factors. In order to evaluate heart rate variability (HRV), the HR and the RR intervals were recorded for 15 min in the supine position. Based on the results of this study, three manuscripts were written:

The **first manuscript** presents the results of 10 men with AMI (57±9 years old) (2nd and 7th day after coronary event) and 11 healthy men (53±4 years old). The HRV analysis was carried out using linear methods in the time domain (TD=RMSSD and SDNN) and frequency domain (FD= low frequency (LF) and high frequency (HF) in normalized units (nu) and LF/HF) and using the non-linear methods approximate entropy (ApEn). A significant relationship between the linear and non-linear methods and the RMSSD, SDNN, LFun, HFun and LF/HF and ApEn indexes was observed. The linear and non-linear HRV indexes from the healthy group were higher than those of the AMI group on the 2nd and 7th days, which suggests that the analysis of HRV with linear methods in the TD and FD and the use of ApEn for linear analysis are in agreement, both for healthy subjects and patients after AMI.

The **second manuscript** presents the results of 52 men (54±5 years old) divided into two groups with coronary obstruction CAD+ ≥ 50% (n=18) and CAD- < 50% (n=17) and one control group (n=17). HRV analysis was carried out with Shannon entropy (SE) and symbolic analysis (0V and 2ULV). The patients with DAC+ presented lower SE (complexity), 2ULV (vagal predominance) and higher 0V (sympathetic predominance) than the DAC- and control groups, which indicates that cardiac autonomic disorder is related to the degree of coronary occlusion and to cardiac impairment.

The **third manuscript** presents the results for risk factors, ACE I/D polymorphism and the indexes in the TD and FD of 151 patients with CAD (56±8 years old, DD=54, DI=70 and II=27). The results show that there was no relation between the ACE I/D polymorphism and HR, BP or HRV. However, the highest indexes of the HRV, which reflect vagal autonomic modulation, are related to a lower percentage of stenosis and the use of ACE inhibitors.

Key words: Heart rate, Coronary disease, Genetic polymorphism, Autonomous nervous system, Non-linear dynamics, Angiotensin converting enzyme.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PRIMEIRO MANSUCRITO

- Figura 1.** Fluxograma representativo da perda amostral 30
- Figura 2:** Box Plot (mediana, intervalo de confiança, 1º e 3º quartis, máximo e mínimo) mostrando os resultados da análise no domínio do tempo (RMSSD, raiz quadrada da somatória do quadrado das diferenças entre os iRR no registro dividido pelo número de iRR em um tempo determinado menos um (2A); RMSM, Raiz quadrada da somatória do quadrado das diferenças dos valores individuais em relação ao valor médio, dividido pelo número de iRR em um período (2B)), no domínio da frequência (BF, baixa frequência (2C) e AF, alta frequência (2D) em un, unidades normalizadas, e BF/AF (2E)) e pelo método não linear (EnAp, entropia aproximada (2F)), comparando o grupo IAM no 2º e no 7º dia com o grupo saudável 40

SEGUNDO MANUSCRITO

- Figura 1:** Box plot (mediana, 1º e 3º quartis, máximo e mínimo), mostrando os resultados da entropia de Shannon (1A) e análise simbólica (0V, padrão sem variação (1B) e 2ULV, padrão com duas variações diferentes (1C)), dos grupos DAC+(pacientes com estenose coronariana $\geq 50\%$), DAC- (pacientes com estenose coronariana $< 50\%$) e controle 58

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRO MANSUCRITO

- Tabela 1.** Idade, características antropométricas, variáveis cardiovasculares e características clínicas dos grupos estudados 37
- Tabela 2.** Correlação entre Entropia Aproximada (EnAp) e os índices no DT e DF da VFC (RMSSD, RMSM, BFun, AFun e Razão BF/AF), para os grupos estudados 39

SEGUNDO MANUSCRITO

- Tabela 1.** Características basais dos voluntários 56
- Tabela 2.** Dados clínicos e angiográficos, fatores de risco e medicamentos 57
- Tabela 3.** Análise multivariada da média dos índices da ES, 0V e 2ULV da VFC dos grupos DAC+, DAC- e GC, relacionados com as variáveis cardíacas, características clínicas, fatores de risco e medicamentos em uso. 60

TERCEIRO MANUSCRITO

- Tabela 1.** Características demográficas e clínicas dos genótipos DD, DI e II do gene da ECA 77
- Tabela 2.** Número e percentual de histórico familiar e de fatores de risco para DAC nos genótipos DD, DI e II do gene da ECA 78
- Tabela 3.** Polimorfismo I/D do gene da ECA e variáveis cardiovasculares 79
- Tabela 4.** Regressão linear entre covariáveis e os índices da variabilidade da frequência cardíaca 80

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitro
µM	Micromol
0V	Padrão sem nenhuma variação
2ULV	Padrão com duas variações diferentes
AF	Alta frequência
ANOVA	Análise de variância
BF	Baixa frequência
bpm	Batimentos por minuto
CK-MB	Creatina quinase do músculo cardíaco
cm	Centímetros
CPK	Isoenzima da creatina fosfoquinase
DAC	Doença arterial coronariana
DAC-	Estenose coronariana <50%
DAC+	Estenose coronariana ≥50%
DD	Homozigoto para o alelo D
DF	Domínio da frequência
DI	Heterozigoto
DNA	Acido desoxirribonucleico
DT	Domínio do tempo
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	ácido etilenodiaminotretacético
EnAp	Entropia Aproximada

ES	Entropia de Shannon
FC	Frequência cardíaca
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
GC	Grupo controle
HDL	lipoproteína de alta densidade
IAM	Infarto agudo do miocárdio
II	Homozigoto para o alelo I
IMC	Índice de massa corpórea
IPAQ	International Physical Activity Questionarie
i-RR	Intervalos R-R
kg	Quilogramas
kg/m ²	Quilogramas por metro ao quadrado
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
m	Metros
MBF	Muito baixa frequência
mg/dL	Miligramas por decilitro
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimol
mmHg	Milímetros de mercúrio
ms	Milissegundos
ms ²	Milissegundos ao quadrado
mV	Milivolt
ng	Nanogramas
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica

PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pmol	Picomol
r	Coefficiente de correlação
R ²	Coefficiente de determinação
RMSM	raiz quadrada da somatória do quadrado das diferenças dos valores individuais em relação ao valor médio, dividido pelo número de intervalos R-R em um período
RMSSD	raiz quadrada da somatória do quadrado das diferenças entre os intervalos R-R no registro dividido pelo número de intervalos R-R em um tempo determinado menos um
UCO	Unidade Coronariana
un	Unidades normalizadas
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca
X ²	Qui-quadrado

LISTA DE ANEXOS

Anexo A	Parecer 63/06 do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Metodista de Piracicaba	99
Anexo B	Parecer 04/09 do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Metodista de Piracicaba	101
Anexo C	Comprovante do aceite de publicação do manuscrito " <i>Linear and nonlinear analysis of heart rate variability in healthy subjects and post acute myocardial infarction patients</i> " no Brazilian Journal of Medical and Biological Research	103
Anexo D	Manuscrito " <i>Linear and nonlinear analysis of heart rate variability in healthy subjects and post acute myocardial infarction patients</i> ", aceite para publicação no Brazilian Journal of Medical and Biological Research	105
Anexo E	Manuscrito "The relationship between cardiac autonomic function and clinical and angiographic characteristics in patients with coronary artery disease", publicado no Brazilian Journal of Physical Therapy	117
Anexo F	Comprovante de submissão do manuscrito " <i>I/D polymorphism of the ACE gene does not influence autonomic modulation of heart rate in patients with coronary disease</i> " no International Journal of Cardiology	126
Anexo G	Manuscrito " <i>I/D polymorphism of the ACE gene does not influence autonomic modulation of heart rate in patients with coronary disease</i> ", submetido ao International Journal of Cardiology	128

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	19
Referências	22
2. PRIMEIRO MANUSCRITO	26
Análise linear e não linear da variabilidade da frequência cardíaca de homens saudáveis e de pacientes com infarto agudo do miocárdio	
2.1. Resumo	27
2.2. Introdução	28
2.3. Material e Métodos	29
2.4. Resultados	36
2.5. Discussão	41
Referências	44
3. SEGUNDO MANSUCRITO	48
Relação entre a modulação autonômica cardíaca e as características clínicas e angiográficas de pacientes com doença arterial coronariana	
3.1. Resumo	49
3.2. Introdução	50
3.3. Métodos	51
3.4. Resultados	55
3.5. Discussão	61
Referências	64
4. TERCEIRO MANUSCRITO	68
O polimorfismo I/D do gene da ECA não influencia a modulação autonômica da frequência cardíaca de pacientes com doença coronariana	
4.1. Resumo	69
4.2. Introdução	70
4.3. Materiais e Métodos	71
4.4. Resultados	75
4.5. Discussão	80
Referências	83

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
6. ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO	90
ANEXOS	98

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A doença cardiovascular é considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade, principalmente, em países ocidentais [1]. No Brasil, as doenças cardiovasculares representam 30% do total de óbitos, e o infarto agudo do miocárdio (IAM) continua sendo a principal causa de mortes [2].

A doença arterial coronariana (DAC), decorrente do processo de aterosclerose, é de natureza multifatorial e sistêmica [3], uma vez que evidências apresentadas na literatura sugerem que os fatores genéticos, fisiológicos e ambientais estão envolvidos na sua etiologia [4]. Dentre os fatores de risco fisiológicos e ambientais podemos citar a hipertensão arterial, dislipidemia, diabetes *mellitus*, obesidade, tabagismo, etilismo, sedentarismo e estresse, os quais estão associados com a progressão da DAC, cujas principais complicações são a angina e o IAM. Essas complicações acarretam em uma variedade de alterações patológicas ao coração, características da doença cardíaca em si [3, 5], e também podem estar associadas com outras patologias e aos fatores de risco já citados, que podem contribuir para o pior prognóstico deste pacientes [6-8].

Dentre as alterações promovidas pela DAC, podemos citar a disfunção da modulação autonômica da FC. Alteração esta comumente avaliada pela técnica de análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), método não invasivo, de fácil aplicação e reprodutibilidade e capaz de estimar as influências do sistema nervoso autonômico sobre o coração e o nó sinusal [9-12]. Quando os índices da VFC encontram-se reduzidos, como em situações de doenças cardiovasculares (IAM e DAC), tem se atribuído menor sobrevida para estes pacientes, bem como aumento do risco para morbi-mortalidade [10, 12-14]. Assim, a VFC tem sido usada para avaliar o balanço do sistema nervoso autônomo, por meio de métodos lineares e não lineares. A literatura reporta que os métodos lineares, baseados nas análises no domínio do tempo e da frequência são considerados adequados para o estudo da VFC [15-19]. Porém, tem surgido o interesse pelo uso de métodos não lineares considerando que o comportamento da FC é dinâmico, irregular e complexo, devido à interação dos mecanismos centrais, reflexos e neurohumorais [20-24].

Sendo assim, com base no que foi exposto, foi desenvolvido um estudo que objetivou avaliar a relação entre métodos lineares no domínio do tempo e da frequência com o método não linear da entropia aproximada em pacientes com IAM e comparar os índices da VFC de pacientes após o IAM com voluntários saudáveis. Esse estudo foi desenvolvido na Unidade Coronariana do Hospital dos Fornecedores de Cana de Piracicaba e da Santa Casa de Misericórdia de Limeira e no Laboratório de Pesquisa em Fisioterapia Cardiovascular e de Provas Funcionais. Desse estudo resultou o manuscrito intitulado *“Linear and nonlinear analysis of heart rate variability in healthy subjects and post acute myocardial infarction patients”*. A partir dos resultados desse estudo, observou-se que a aplicação dos métodos lineares e do método não linear na análise da VFC são concordantes.

Devido à dificuldade de selecionar pacientes com IAM que concordassem em participar do estudo e que atendessem os critérios de inclusão, a pesquisa foi direcionada para pacientes com diagnóstico de DAC com diferentes características clínicas e angiográficas e com fatores de risco associados. Com isso, foi possível desenvolver o segundo manuscrito intitulado *“The relationship between cardiac autonomic function and clinical and angiographic characteristics in patients with coronary artery disease”*. Esse estudo foi desenvolvido no Centro de Hemodinâmica (Emcor) da Santa Casa de Misericórdia de Piracicaba, e no Laboratório de Pesquisa em Fisioterapia Cardiovascular e de Provas Funcionais. O objetivo foi avaliar a modulação autonômica da FC de pacientes com DAC com diferentes percentuais de estenose coronariana, a partir de métodos não lineares baseados na entropia de Shannon e análise simbólica [25-27]. Os resultados indicam que na DAC não complicada, os parâmetros da VFC mostram menor complexidade da modulação autonômica da FC, maior modulação autonômica simpática e menor modulação autonômica parassimpática, em condições basais, as quais estão relacionadas com o percentual de estenose coronariana.

Considerando a influência de vários fatores de risco na evolução da DAC e nas respostas da modulação autonômica da FC [7, 28-30], o estudo foi direcionado no sentido de avaliar a influência do fator genético e de fatores de risco sobre as respostas da modulação autonômica da FC em pacientes com DAC. Dentre os fatores genéticos, estudos de associação têm sido realizados com o intuito de compreender a influência dos polimorfismos do sistema renina angiotensina (SRA),

como o gene da enzima conversora de angiotensina (ECA), sobre a homeostase cardiovascular [31-37]. Existem divergências na literatura sobre a relação entre o polimorfismo I/D do gene da ECA e o controle autonômico da FC, sendo observada associação direta e inversa do genótipo DD com os índices de VFC, bem como ausência de associação [5, 35, 38, 39]. Porém, não foram encontrados estudos na literatura que associam o polimorfismo I/D do gene da ECA com os índices da VFC de pacientes com DAC. Assim, foi realizado o terceiro manuscrito intitulado "*I/D polymorphism of the ACE gene does not influence autonomic modulation of heart rate in patients with coronary disease*". Nesse estudo, tivemos por objetivo avaliar a influência do polimorfismo I/D do gene da ECA na modulação autonômica da FC em pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e sua associação com fatores de risco. Os resultados mostram que não há relação entre o polimorfismo I/D do gene da ECA com a FC, PA e VFC, porém os maiores índices da VFC estão relacionados ao menor percentual de estenose e ao uso de inibidores da ECA.

Os manuscritos desenvolvidos serão apresentados a seguir, em formato de artigo científico, traduzidos para o português, de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação. Os manuscritos publicados e submetido estão nos anexos D, E e G.

Referências

- [1] Myocardial infarction redefined – A consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *Eur Heart J* 2000; 21: 1502-1513.
- [2] Piegas LS, Feitosa G, Mattos LA, Nicolau JC, Rossi Neto JM, Timerman A, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST. *Arq Bras Cardiol* 2009; 93(6 supl.2): e179-e264.
- [3] Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol* 2007; 88 supl I.
- [4] Talbert RL. Ischemic heart disease. In: DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, ed. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. 6th ed. New York: Elsevier; 2005: 219-250.
- [5] Pinho RA, Araújo MC, Ghisi GLM, Benetti M. Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. *Arq Bras Cardiol* 2010; 94(40): 549-555.
- [6] Liao D, Cai J, Rosamond JC, Barnes RW, Hutchinson RG, Whitsel EA, et al. Cardiac autonomic function and incident coronary heart disease: a population-based case-cohort study. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 696-706.
- [7] Thayer JF, Yamamoto SS, Brosschot JF. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. *Inter J Cardiol* 2010; 141: 122-131.
- [8] Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 1999; 100: 1481-1492.
- [9] Vanderlei LCM, Silva RA, Pastre CM, Azevedo FM, Godoy MF. Comparison of the S810i Polar monitor and the ECG for the analysis of heart rate variability in the time and frequency domains. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41: 854-859.
- [10] Bigger JT Jr, Fleiss JL, Steinman RC, Rolnitzky LM, Kleiger RE, Rottman JN. Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation* 1992; 85: 164-71.
- [11] Huikuri HV, Makukallio TH. Heart rate variability in ischemic heart disease. *Auton Neurosci* 2001; 90: 95-1001.
- [12] Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation* 1996; 93(5): 1043-65.

- [13] Kleiger RE, Stein PK, Bosner MS, Rottman JN. Time domain measurements of heart rate variability. In: Malik M, Camm AJ. New York: Heart rate variability 1995; 33-45.
- [14] Huikuri HV, Jokinen V, Syvanne M, Nieminen MS, Airaksinen KE, Ikaheimo MJ, et al. Heart rate variability and progression of coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1979-85.
- [15] Stein PK, Domitrovich PP, Huikuri HV, Kleiger RE, Cast Investigators. Traditional and nonlinear heart rate variability are each independently associated with mortality after myocardial infarction. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005; 16: 13-20.
- [16] Wallin BG, Charkoudian N. Sympathetic neural control of integrated cardiovascular function: insights from measurement of human sympathetic nerve activity. *Muscle Nerve* 2007; 36: 595-614.
- [17] Santos-Hiss MDB, Melo RC, Neves VR, Hiss FC, Verzola RMM, Silva E, et al. Effects of progressive exercise during phase I cardiac rehabilitation on the heart rate variability of patients with acute myocardial infarction. *Disabil Rehabil* 2011; 33(10): 835-42.
- [18] Pantoni CB, Di Thommazo L, Mendes RG, Catai AM, Luzzi S, Amaral Neto O, et al. Effects of different levels of positive airway pressure on breathing pattern and heart rate variability after coronary artery bypass grafting surgery. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44(1): 38-45.
- [19] Perseguini NM, Takahashi ACM, Rebelatto JR, Silva E, Borghi-Silva A, Porta A, et al. Spectral and symbolic analysis of the effect of gender and postural change on cardiac autonomic modulation in healthy elderly subjects. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44: 29-37.
- [20] Oliveira DJ, Gomes MED, Guimarães HN, Aguirre LA. Síntese de sinais de variabilidade da frequência cardíaca baseada em modelagem não linear. *Rev Soc Bras Eng Biomédica* 2006; 22(1): 51-62.
- [21] Krstacic G, Krstacic A, Smalcelj A, Milicic D, Gostovic MJ. The chaos theory and nonlinear dynamics in heart rate variability analysis: does it work in short-time series in patients with coronary heart disease? *ANE* 2007; 12 (2): 130-136.
- [22] Porta A, Guzzetti S, Montano N, Furlan R, Pagani M, Malfiani A, et al. Entropy, Entropy Rate, and Pattern Classification as Tools to Typify Complexity in Short Heart Period Variability Series. *IEEE Trans Biomed Eng* 2001; 48(11): 1282-91.
- [23] Guzzetti S, Borroni E, Garbelli PE, Ceriani E, Della BP, Montano N, et al. Symbolic dynamics of heart rate variability: a probe to investigate cardiac autonomic modulation. *Circulation* 2005; 112(4): 465-70.
- [24] Huikuri HV, Mäkikallio TH, Peng C-K, Goldberger AL, Hintze U, Moller M – DIAMOND Study Group. Fractal Correlation Properties of R-R interval Dynamics and Mortality in Patients With Depressed left Ventricular Function After Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2000; 101: 47-53.

- [25] Porta A, Di Rienzo MD, Wessel N, Kurths J. Addressing the complexity of cardiovascular regulation. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 2009; 367(1892): 1215-8.
- [26] Porta A, Guzzetti S, Montano N, Furlan R, Pagani M, Malliani A, et al. Entropy, Entropy Rate, and Pattern Classification as Tools to Typify Complexity in Short Heart Period Variability Series. *IEEE Trans Biomed Eng* 2001; 48(11): 1282-91.
- [27] Guzzetti S, Borroni E, Garbelli PE, Ceriani E, Della Bella P, Montano N, et al. Symbolic dynamics of heart rate variability: a probe to investigate cardiac autonomic modulation. *Circulation* 2005; 112(4): 465-70.
- [28] Mussalo H, Vanninen E, Ikaheimo R, Laitinen T, Laakso M, Länsimies E, et al. Heart rate variability and its determinants in patients with severe or mild essential hypertension. *Clin Physiol* 2001; 21: 594-604.
- [29] Pehlivanidis AN, Athyros VG, Demitriadis DS, et al. Heart rate variability after long-term treatment with atorvastatin in hypercholesterolaemic patients with or without coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2001; 157: 463-9.
- [30] Vaccarino V, Lampert R, Bremner JD, Lee F, Su S, Maisano C. Depressive symptoms and heart rate variability: evidence for a shared genetic substrate in a study of twins. *Psychosom Med* 2008; 70: 628-36.
- [31] Nakai K, Itoh C, Miura Y, Hotta K, Musha T, Itoh T, et al. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation* 1994; 90: 2199-2202.
- [32] Unger T. The role of the renin– angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2002; 89: 3A–9A.
- [33] Stedds RP, Fletcher J, Parry H, Chowdhary S, Channer KS, West J, et al. The angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and heart rate variability following acute myocardial infarction. *Clin Auton Res* 2002; 12: 66-71.
- [34] Thayer JF, Merritt MM, SollersJJ, Zonderman AB, Evans MK, Yie S, et al. Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism DD Genotype on High-Frequency Heart Rate Variability in African Americans. *Am J Cardiol* 2003; 92: 1487–1490.
- [35] Cicoira M, Zanolla L, Rossi A, Golia G, Franceschini L, Cabrini G, et al. Failure of aldosterone suppression despite angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor administration in chronic heart failure is associated with ACE DD genotype. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1808-12.
- [36] Murphey LJ, Gainer JV, Vaughan DE, Brown NJ. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism modulates the human in vivo metabolism of bradykinin. *Circulation* 2000; 102: 829-32.
- [37] Darrell R. Abernethy, Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting

enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl-carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 1433.

- [38] Busjahn A, Voss A, Knoblauch H, Knoblauch M, Jeschke E, Wessel N, et al. Angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms and heart rate variability in twins. *Am J Cardiol* 1998; 81: 755–760.
- [39] Nishikino M, Matsunaga T, Yasuda K, Adachi T, Moritani T, Tsujimoto G, et al. Genetic variation in the rennin-angiotensin system and autonomic nervous system function in young healthy japanese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4676-4681.

2. PRIMEIRO MANUSCRITO

(versão em português)

Autores: Vandeni Clarice Kunz, Érica Nicolau Borges, Regina Célia Coelho, Luiz Antonio Gubolino, Luis Eduardo Barreto Martins, Ester da Silva.

Título: Análise linear e não linear da variabilidade da frequência cardíaca de homens saudáveis e de pacientes após infarto agudo do miocárdio.

Periódico: Manuscrito aceito para publicação na Brazilian Journal of Medical and Biological Research (ANEXOS D)

2. PRIMEIRO MANUSCRITO

“Análise linear e não linear da variabilidade da frequência cardíaca de homens saudáveis e de pacientes após infarto agudo do miocárdio”

2.1. Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar e comparar o uso de métodos lineares e não linear na análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) de pacientes após infarto agudo do miocárdio (IAM) e de saudáveis. A frequência cardíaca (FC) foi captada na posição supina durante 15min em 10 homens com IAM no 2º e no 7º dia após evento coronariano, em uso de betabloqueador (57 ± 9 anos) e 11 saudáveis (53 ± 4 anos). A análise da VFC no domínio do tempo (RMSSD e RMSM) e da frequência pelas bandas de baixa e alta frequência em unidades normalizadas (un) (BFun e AFun) e razão BF/AF e pela entropia aproximada (EnAp), foi realizada a partir dos intervalos R-R (ms). A correlação foi significativa entre os índices RMSSD, RMSM, BFun, AFun e BF/AF com a EnAp do grupo IAM no 2º ($r= 0,87; 0,65; 0,72; 0,72$ e $0,64$) e no 7º dia ($r= 0,88; 0,70; 0,69; 0,69$ e $0,87$) e do grupo saudável ($r= 0,63; 0,71; 0,63; 0,63$ e $0,74$), respectivamente. Os índices medianos da VFC do grupo IAM no 2º e no 7º dia e grupo saudável foram: RMSSD 10,37; 19,95 e 24,81; RMSM 23,47; 31,96 e 43,79; BFun 0,79; 0,79 e 0,62; AFun 0,20; 0,20 e 0,37; BF/AF 3,87; 3,94 e 1,65 e EnAp 1,01; 1,24 e 1,31, respectivamente. Os índices da VFC do grupo saudável apresentaram diferenças em relação ao grupo IAM no 2º e no 7º dia. A VFC analisada pelos métodos lineares e não linear são concordantes, sugerindo que ambos apresentam o mesmo poder de avaliação da modulação autonômica da FC tanto para os saudáveis como para os pacientes após IAM. O IAM contribui para a redução da irregularidade do sinal cardíaco, maior modulação simpática e menor modulação vagal.

Palavras-chave: Infarto do Miocárdio; Variabilidade da Frequência Cardíaca; Sistema Nervoso Autônomo.

2.2. Introdução

A avaliação da integridade da modulação autonômica da frequência cardíaca (FC) se dá a partir da análise de sua variabilidade (VFC), que se refere às oscilações nos intervalos entre batimentos cardíacos consecutivos, conhecidos como intervalos R-R (iRR) [1]. Esse método de avaliação é susceptível de aplicações clínicas variadas, sendo extensamente usada na área da cardiologia por ser um método não invasivo, de fácil aplicação e alta reprodutibilidade [1,2].

É bem estabelecido que o controle da modulação autonômica da FC está associado a integridade de complexas interações entre as variáveis eletrofisiológicas, humorais e hemodinâmicas [2,3]. Porém, tem sido considerado que a FC apresenta comportamento não linear devido às interações complexas entre vários sistemas (central, mecanismos reflexos e fatores neurohumorais) [3-7].

A literatura menciona que os métodos lineares são amplamente explorados e considerados adequados para o estudo da VFC [8-12]. Porém nos últimos anos tem suscitado o interesse pelo uso de métodos não lineares [4-7,13-15] baseados em observações de que as flutuações da FC estão subordinadas ao controle do sistema nervoso autônomo sobre a atividade cardíaca e dinâmica vascular [14], sugerindo que os mecanismos envolvidos na regulação cardiovascular interagem e tem repercussões em diferentes órgãos.

Dentre os métodos não lineares, a entropia aproximada (EnAp) possibilita avaliar a regularidade de séries temporais e é utilizada para analisar dados fisiológicos e clínicos [13, 14]. Assim, a EnAp fornece informações quantitativas da complexidade ou redução do comportamento irregular do sinal, captados tanto a curto como a longo prazo [2-4,13-15]. A aplicação da EnAp na análise do sinal cardíaco, fornece informações da modulação autonômica da FC, sendo que a maior regularidade do sinal está relacionada a situações patológicas como no infarto agudo do miocárdio (IAM). No entanto, o estudo que avaliou a VFC 30 dias em média após o IAM sem uso de betabloqueadores, não verificou correlação entre os índices dos métodos lineares com os não lineares. Porém, observaram que os pacientes com IAM apresentavam maior irregularidade da dinâmica da FC em relação aos saudáveis [2].

Santos-Hiss et al. [10] utilizando métodos lineares para avaliar a evolução da modulação autonômica da FC de pacientes em uso de betabloqueadores, que receberam intervenção clínica de rotina, a curto prazo, entre o 1º e o 6º dia após o IAM, não observaram modificações dos índices da VFC.

Assim, no presente estudo, temos como hipótese que a aplicação de métodos não lineares como a EnAp e métodos lineares, nos domínios do tempo (DT) e da frequência (DF), podem ser utilizados para identificar e avaliar a dinâmica da FC em pacientes após IAM em uso de betabloqueadores e voluntários saudáveis. Adicionalmente, pacientes após o IAM apresentam alterações da dinâmica da modulação autonômica da FC em relação aos voluntários saudáveis.

Os objetivos do estudo foram: 1) avaliar a relação entre a análise da VFC no DT e no DF com a EnAp de pacientes após IAM em uso de betabloqueadores e de voluntários saudáveis; 2) comparar os índices da VFC entre o 2º e o 7º dia dos pacientes após o IAM; 3) comparar os índices da VFC entre os grupos IAM e voluntários saudáveis.

2.3. Material e Métodos

Desenho e voluntários estudados

Sessenta e quatro voluntários (36 com IAM e 28 saudáveis) com idades entre 50 a 65 anos foram selecionados a partir de convite e divulgação por cartazes. Destes, 10 homens com IAM (57 ± 9 anos) e 11 saudáveis (54 ± 3 anos) completaram o estudo. A figura 1 é um diagrama de fluxo que representa de forma detalhada a perda amostral deste estudo.

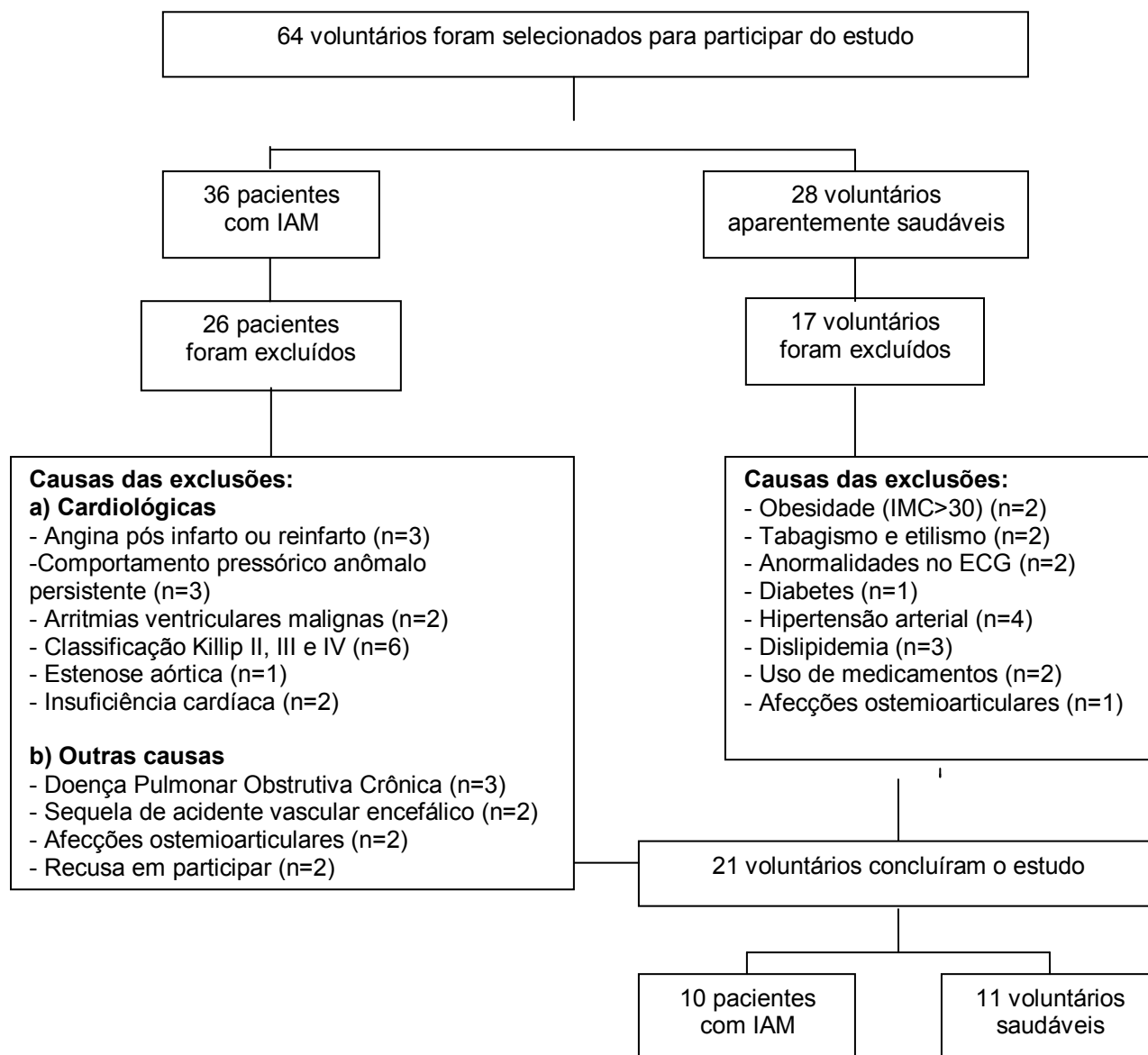


Figura 1: Fluxograma representativo da perda amostral.

O grupo IAM foi selecionado na Unidade Coronariana (UCO) do Hospital dos Fornecedor de Cana de Piracicaba – SP e da Santa Casa de Misericórdia de Limeira – SP. Do total de 36 pacientes admitidos na UCO com diagnóstico de IAM, 10 pacientes foram incluídos, submetidos à ecocardiograma Doppler e cateterismo cardíaco, com reperfusão química ou mecânica nas primeiras horas após o diagnóstico de IAM, faziam uso de terapia betabloqueadora (atenolol, $46 \pm 9,4$ mg/dia), com fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) dentro da normalidade ($0,61 \pm 0,06$), com classificação clínica Killip I e estilo de vida sedentário. Para a composição do grupo saudável, foram avaliados 28 voluntários saudáveis sedentários, sendo incluídos 11 voluntários que não apresentaram evidências de anormalidades

cardiovasculares, respiratórias, osteomioarticulares e/ou metabólicas; não faziam uso de medicamentos e nem eram fumantes ou etilistas.

Os voluntários de ambos os grupos foram atendidos pela equipe médica dos Hospitais e passaram por avaliação clínica e cardiovascular e realizaram também exames bioquímicos de sangue (colesterol total e frações (HDL, LDL) glicemia, triglicérides, creatinina e ácido úrico).

O diagnóstico de IAM foi confirmado pela presença de dois ou mais critérios: 1) precordialgia ou dor retroesternal, constritiva ou em queimação, com ou sem irradiação para membros superiores, pescoço e dorso, com duração >30 minutos e sem alívio ao vasodilatador; 2) supradesnivelamento do segmento ST >1 mV, em pelo menos 2 ou mais derivações contíguas no eletrocardiograma (ECG), 3) elevação dos marcadores de necrose miocárdicos CK-MB e CPK, duas vezes os valores normais [16].

O estudo foi transversal, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Metodista de Piracicaba (protocolo 63/06). Os voluntários foram orientados sobre a relevância do trabalho, dos procedimentos experimentais e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Procedimento experimental

Os dados de FC e pressão arterial (PA) do grupo IAM foram captados no 2^o e no 7^o dia após o evento coronariano, na UCO e do grupo saudável foi realizado no Laboratório de Pesquisa da Instituição. Os protocolos foram realizados pelos mesmos profissionais, e sempre no período da manhã para que as variáveis estudadas estivessem sob as mesmas influências do ciclo circadiano. Esses ambientes eram climatizados artificialmente, com a temperatura e a umidade relativa do ar em torno de 23°C e 50%, respectivamente. Os voluntários foram instruídos a não ingerir cafeína ou bebidas alcoólicas e não realizar exercício extenuante no dia anterior a aplicação do protocolo. No dia do experimento os voluntários foram entrevistados se haviam seguido as recomendações prévias ao protocolo e examinados se as condições de controle (FC e PA) estavam em escala normal. Antes do experimento, os voluntários foram familiarizados com os equipamentos e com o protocolo experimental a fim de reduzir a ansiedade.

Protocolo experimental

Os voluntários permaneceram em repouso na postura supina durante 10 min. Em seguida a FC e os iRR foram registrados continuamente, batimento a batimento, durante 15 min, utilizando o Freqüencímetro Polar® modelo S810i (*Polar Electro Oy, Finland*). Esse sistema detecta a despolarização ventricular, correspondente a onda R do eletrocardiograma, com uma frequência de amostragem de 500Hz e resolução temporal de 1ms [17], e previamente validado por Loimaala et al. [18], Gamelin et al. [19] e Vanderlei et al. [20]. Os iRR captados por meios do monitor de FC podem ser analisados por meio de métodos lineares e não lineares, incluindo a EnAp [21].

Os sinais foram gravados e armazenados no freqüencímetro e posteriormente transferidos por meio de uma interface para um computador compatível. A PA também foi aferida por três vezes na condição de repouso pelo método auscultatório de Korotkoff por meio de um esfigmomanômetro de coluna de mercúrio (WanMed, São Paulo, SP, Brasil) e um estetoscópio (Littman, St. Paul, MN, USA).

Análise dos dados

Para análise da FC de repouso, foi utilizado o valor médio da coleta de 15 min, e para a PA foi utilizado o valor médio das aferições.

Inicialmente foi realizada uma inspeção visual da distribuição dos iRR (ms) do ECG para a seleção dos trechos com maior estabilidade do sinal, substituindo-se batimentos ectópicos, considerando-se 700 pontos, para a realização das análises.

A análise da VFC foi realizada a partir de métodos lineares: A) no domínio do tempo (DT), índices temporais RMSSD (Raiz quadrada da somatória do quadrado das diferenças entre os iRR adjacentes no registro dividido pelo número de iRR, menos um, expressa em ms), que representa a modulação autonômica vagal e simpática, mas com predomínio vagal; RMSM (Raiz quadrada da somatória do quadrado das diferenças dos valores individuais em relação ao valor médio, dividido pelo número de iRR em um período), que representa a variabilidade como um todo [1]. B) no domínio da frequência (DF), por meio de modelo autoregressivo [22, 23] dos iRR previamente selecionados. Pelos componentes do espectro de potência foram obtidas as bandas de muito baixa frequência (MBF=0,003 a 0,04Hz), de baixa

frequência (BF=0,04 a 0,15 Hz) e de alta frequência (AF=0,15 a 0,4 Hz) e a razão entre as áreas absolutas de baixa e de alta frequência (razão BF/AF). A normalização foi realizada a partir da divisão da potência absoluta de um dado componente ms^2 (BF ou AF) pelo espectro de potência total subtraindo o componente de MBF e multiplicado por 100. As bandas AF e BF representam a atuação dos componentes vagal e simpático no controle da FC, respectivamente [1].

O método não linear, pela EnAp, foi determinado de acordo com Pincus [13,14,15]. A idéia básica da EnAp é determinar a medida de correlação para os m blocos da amostra do sinal. Considere x_i e x_j qualquer par de blocos de tamanho m da amostra do sinal representado por $u(1), u(2), \dots, u(N)$, sendo N o número da amostra do sinal, m um inteiro positivo ($m \leq N$) que indica o tamanho dos blocos usados para a comparação, e um número inteiro positivo r que define o limite superior para a consideração de similaridade entre x_i e x_j . Desta forma, é possível definir a medida de correlação como:

$$C_i^m(r) = \frac{B_i}{N - m + 1}$$

sendo B_i o número de blocos $x(j)$ com distância máxima de $x(j) \leq r$, isto é, o número de blocos $x(j)$ de tal forma que $d[x(i), x(j)] \leq r$, e $(N - m + 1)$ é a quantidade total de vetores de tamanho m no sinal.

A distância entre dois vetores pode ser calculada como:

$$d[x(i), x(j)] = \max_{k=1, \dots, m} (|u(i+k-1) - u(j+k-1)|)$$

A seguinte medida acrescenta contribuições do log das correlações:

$$\Phi^m(r) = \frac{\sum_{i=1}^{N-m+1} \log C_i^m(r)}{N-m+1}$$

sendo que \log representa o logaritmo natural. A função calcula o logaritmo natural médio das funções $C_i^m(r)$.

EnAp é definida como:

$$ApEn(m, r) = \begin{cases} \lim_{N \rightarrow \infty} \{ \Phi^m(r) - \Phi^{m+1}(r) \}, & m > 0 \\ \lim_{N \rightarrow \infty} \{ -\Phi^1(r) \}, & m = 0 \end{cases}$$

Dada N amostras do sinal, a EnAp é implementada definindo a seguinte estatística:

$$ApEn(m, r) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N-m} \left[\frac{1}{N-m} \sum_{j=1}^{N-m-i} \left[\frac{1}{N-m-i-j} \sum_{k=1}^{N-m-i-j} \left[\frac{1}{N-m-i-j-k} \sum_{l=1}^{N-m-i-j-k} |x_{i+j+k+l} - x_i| \right] \right] \right]$$

Em nosso estudo, foram definidos os seguintes valores para as variáveis: $m = 2$ (determina o tamanho dos blocos usados para a comparação), $r = 20\%$ multiplicado pelo desvio padrão do sinal (estabelece o limite superior na consideração de similaridade entre os dados), e $N = 700$ (representa o número de pontos no sinal).

Os dados foram analisados utilizando-se o aplicativo MATLAB 6.5 R13, seguindo-se a rotina para análise da VFC.

Análise estatística

A partir da análise de distribuição de frequências (Kolmogorov-Smirnov) os dados não apresentaram distribuição normal. Para avaliar a relação entre as análises da VFC no DT e no DF com a EnAp foi aplicada a regressão linear simples, tanto no grupo IAM no 2º e no 7º dia, como para o grupo saudável. Para a comparação dos dados da VFC do grupo IAM no 2º e no 7º dia após o evento coronariano, foi realizado o teste não-paramétrico de Wilcoxon e para comparação do grupo IAM no 2º e no 7º dia com o grupo saudável, foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Nível de significância estabelecido em 5% para todas as análises e os cálculos foram realizados utilizando o programa BioEstat 5.0. O cálculo amostral, a partir do desvio padrão da variável RMSSD, para o nível de confiança de 95% e *power* de 80%, sugeriu o número de 10 voluntários para cada grupo.

2.4. Resultados

Características da amostra

Na tabela 1 estão apresentados os dados do grupo IAM e do grupo saudável em relação à idade, as características antropométricas, variáveis cardiovasculares em condição de repouso não apresentaram diferenças ($p > 0,05$). Assim como as características clínicas e medicamentos em uso do grupo IAM.

Tabela 1. Idade, características antropométricas, variáveis cardiovasculares e características clínicas dos grupos estudados.

Idade e características antropométricas	GRUPO IAM (n=10)	GRUPO SAUDÁVEL (n=11)
Idade (anos)	57±9	54±3
Estatura (m)	1,67±0,04	1,69±0,05
Massa corporal (kg)	74,60±13,09	79,59±8,34
IMC (kg/m ²)	26,81±4,22	27,86±3,11
Variáveis Cardiovasculares		
FC (bpm)	65,70±10,86	70,18±9,58
PAS (mmHg)	126,00±13,49	116,42±6,43
PAD (mmHg)	76,00±10,74	77,73±4,10
Características clínicas		
Tabagismo	5(50)	0(0)
Hipertensão ≥ 140/90 mmHg	2(20)	0(0)
Hiperglicemia de Jejum ≥ 126 mg/dl	3(30)	0(0)
Hipercolesterolemia > 240 mg/dl	3(30)	0(0)
Hipertrigliceridemia > 200 mg/dl	4(40)	0(0)
Localização do IAM		
Anterior	3(30)	--
Postero- inferior	7(70)	--
Classificação clínica Killip I	10(100)	
FEVE >40%	10(100)	--
Reperusão		
Química	4(40)	--
Mecânica	6(60)	--
Medicamentos		
Betabloqueadores	10(100)	--
IECA	2(20)	--

Dados expressos em média e desvio padrão, valores absolutos e porcentagem. IAM=infarto agudo do miocárdio; IMC=índice de massa corporal; FC=frequência cardíaca; PAS=pressão arterial sistólica; PAD=pressão arterial diastólica; FEVE=fração de ejeção do ventrículo esquerdo; IECA=inibidores da enzima conversora de angiotensina.

(Teste de Mann-Whitney para comparar idade e características antropométricas e variáveis cardiovasculares entre os grupos).

Análise dos índices de VFC

Na análise de regressão linear entre os índices no DT e no DF com a EnAp, verifica-se relação significativa ($p < 0,05$), tanto para o grupo IAM no 2° e no 7° dia após evento coronariano, como para o grupo saudável (Tabela 2).

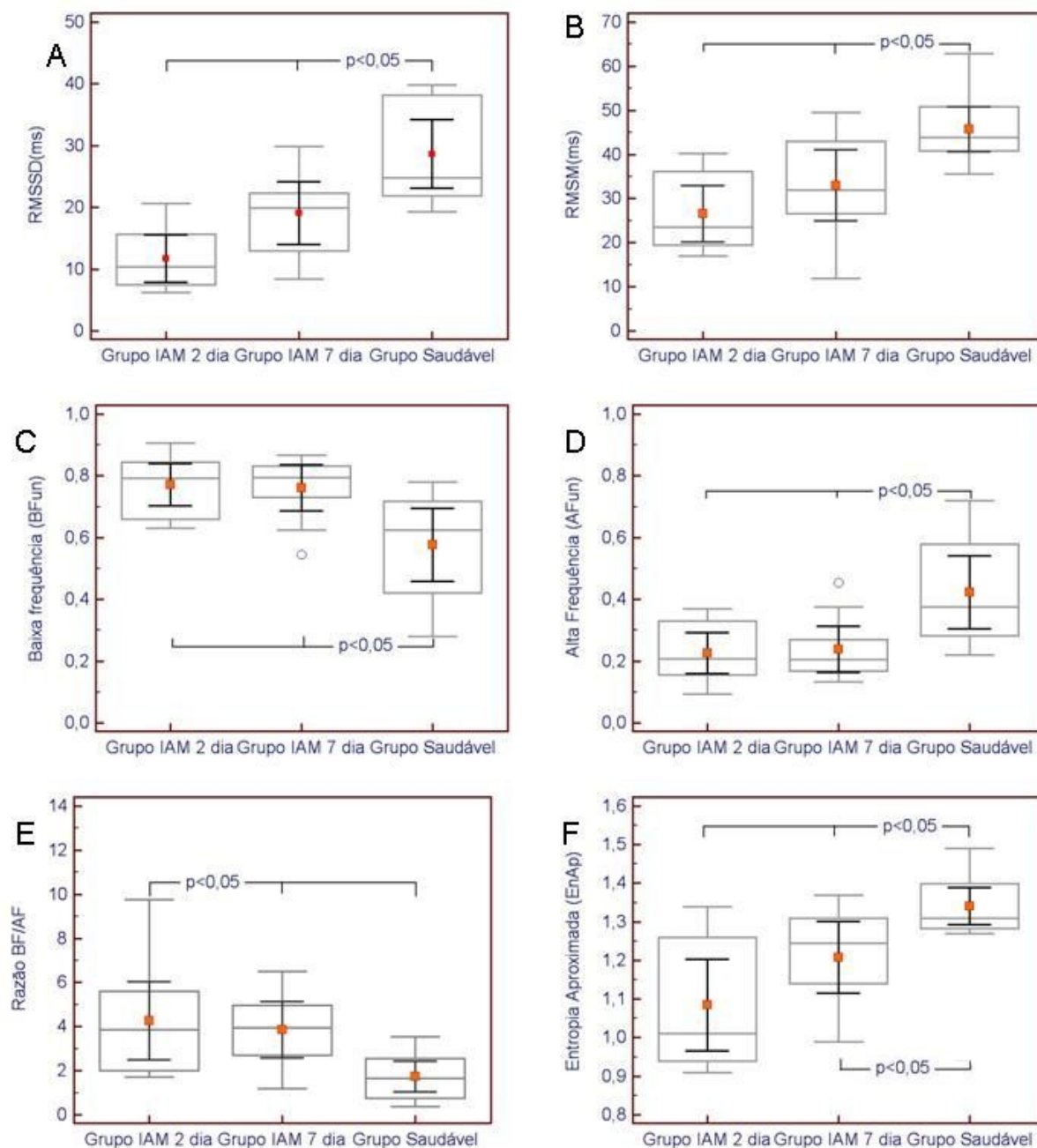
As figuras 2A e 2B mostram maiores índices de RMSSD e RMSM da VFC do grupo saudável ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo IAM no 2° e no 7° dia. Já os índices do grupo IAM no 2° e 7° dia foram semelhantes ($p > 0,05$). Na análise no domínio da frequência foi observado maior índice de BFun (Figura 2C) e BF/AF (Figura 2E) e menor índice de AFun (Figura 2D) do grupo IAM no 2° e no 7° dia quando comparado ao grupo saudável ($p < 0,05$), o que indica que o grupo saudável apresenta menor modulação simpática e maior modulação vagal em relação ao grupo IAM. Na comparação intragrupo para esses índices, não houve diferenças ($p > 0,05$). Pela análise não linear da VFC, baseada na EnAp (Figura 2E), não foram observadas diferenças na comparação intragrupo ($p > 0,05$), porém o grupo saudável apresentou maiores valores ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo IAM no 2° e no 7° dia.

Tabela 2. Correlação entre Entropia Aproximada (EnAp) e os índices no DT e DF da VFC (RMSSD, RMSM, BFun, AFun e Razão BF/AF), para os grupos estudados.

	GRUPO IAM			GRUPO IAM			GRUPO SAUDÁVEL		
	2º dia (n=10)			7º dia (n=10)			(n=11)		
	R ²	r	p	R ²	r	p	R ²	r	p
EnAp									
RMSSD (ms)	0,72	0,87	0,00	0,75	0,88	0,00	0,34	0,63	0,03
RMSM (ms)	0,35	0,65	0,03	0,43	0,70	0,02	0,45	0,71	0,01
BFun	0,46	0,72	0,01	0,41	0,69	0,02	0,33	0,63	0,03
AFun	0,46	0,72	0,01	0,41	0,69	0,02	0,33	0,63	0,03
Razão BF/AF	0,33	0,64	0,04	0,74	0,87	0,00	0,50	0,74	0,00

R²=coeficiente de determinação; r=coeficiente de correlação; EnAp=entropia aproximada; RMSSD=raiz quadrada da somatória do quadrado das diferenças entre os iRR no registro dividido pelo número de iRR em um tempo determinado menos um; RMSM=Raiz quadrada da somatória do quadrado das diferenças dos valores individuais em relação ao valor médio, dividido pelo número de iRR em um período; ms=milissegundos; DF=domínio da frequência; BF=baixa frequência; AF=alta frequência; un=unidades normalizadas;

(Regressão linear simples).



Legenda

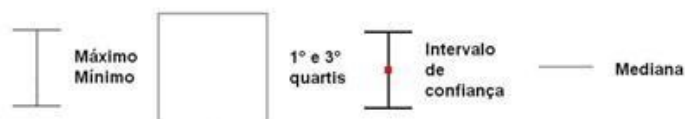


Figura 2: Box Plot (mediana, intervalo de confiança, 1° e 3° quartis, máximo e mínimo) mostrando os resultados da análise no domínio do tempo (RMSSD, raiz quadrada da somatória do quadrado das diferenças entre os iRR no registro dividido pelo número de iRR em um tempo determinado menos um (2A); RMSM, Raiz quadrada da somatória do quadrado das diferenças dos valores individuais em relação ao valor médio, dividido pelo número de iRR em um período (2B)), no domínio da frequência (BF, baixa frequência (2C) e AF, alta frequência (2D) em un, unidades normalizadas, e BF/AF (2E)) e pelo método não linear (EnAp, entropia aproximada (2F)), comparando o grupo IAM no 2° e no 7° dia com o grupo saudável.

2.5. Discussão

Os resultados do presente estudo mostram, pela análise de regressão linear entre a EnAp com os métodos lineares no DT e no DF, que os valores de coeficiente de determinação e de correlação foram significativos tanto para o grupo IAM no 2° e no 7° dia após evento coronariano, bem como para o grupo saudável. Esses resultados diferem dos achados de Makikallio et al.[2], que comparando VFC no DT e DF com EnAp, em pacientes após IAM, observaram que quanto menores os valores no DT e DF, maiores eram os valores da EnAp. As divergências dos nossos resultados em relação aos dos autores acima podem ser atribuídas à metodologia de processamento dos dados, assim como à interrupção do uso de betabloqueador e do inibidor da ECA. Porém esses autores referem que o IAM é que contribui para aumento do tônus simpático refletindo no aumentando da complexidade do sinal e que o sistema β -adrenérgico tem pouca participação na dinâmica não linear da VFC [24]. No entanto, consideramos que a não diferença dos nossos resultados da VFC entre a análise não linear EnAp em relação aos índices tanto no DT como no DF pode ser atribuída ao bloqueio do β -adrenoreceptor.

Beckers et al. [24] avaliando a ação da atividade simpática e vagal na resposta da complexidade da FC, observaram que após bloqueio farmacológico parcial do componente vagal ocorreu redução da complexidade não linear da VFC, sugerindo que a atuação vagal é responsável pela introdução de complexidade na variação da FC.

Krstacic et al. [4] referem que os menores índices da EnAp de pacientes após o IAM em relação a saudáveis pode estar relacionado a perda da complexidade e irregularidade do sinal, pelo fato de ocorrer redução da VFC, aumento da modulação autonômica simpática e redução da modulação autonômica vagal.

No que se refere à comparação dos índices de VFC, avaliados no 2° e no 7° dia após o IAM, em nosso estudo não encontramos diferenças tanto para as análises no DT e DF como para EnAp. Essa similaridade deve ser considerada pelo pequeno período de avaliação, ou seja, um intervalo de 5 dias. Outro fato que deve ser considerado é o uso de medicamentos, especificamente os betabloqueadores e a conduta de reperfusão química ou mecânica realizada no 1° dia após o IAM.

De acordo Piegas et al. [16], os betabloqueadores são medicamentos de primeira escolha para tratar o IAM, de modo a diminuir as demandas de oxigênio do miocárdio, da FC, da PA e da contratilidade cardíaca. Lampert et al. [25] mencionam que estes medicamentos além de reduzirem a incidência de morbidade e mortalidade, têm ação direta sobre o SNA, pois antagonizam de forma específica a ação das catecolaminas nos receptores beta-adrenérgicos, e conseqüentemente, alteram os índices de VFC, reduzindo a atividade simpática, e promovendo uma recuperação parassimpática.

Considerando as ações dos betabloqueadores sobre a modulação autonômica da FC, em nosso estudo verificamos que apesar de todos os pacientes do grupo IAM fazerem uso desse medicamento, os índices de VFC apresentaram-se similares no 2º e no 7º dia após o evento coronariano. Do mesmo modo, Carpeggiani et al. [26] também não observaram diferenças nos índices de VFC no momento da admissão hospitalar comparado ao momento da alta hospitalar.

Por outro lado, tem sido referido que pacientes com IAM que iniciaram o uso de betabloqueadores entre 5 a 21 dias após internação hospitalar durante 6 semanas apresentaram um aumento significativo dos índices no DT de RMSSD e no DF do componente AF e redução da razão BF/AF [25]. Esses resultados podem ser atribuídos ao período de uso de betabloqueador o qual tem efeito sobre a modulação autonômica da FC.

Por outro lado deve-se considerar que a reperfusão química ou mecânica empregada imediatamente após IAM e bem sucedida, contribui para manter preservadas as funções autonômicas ou até mesmo aumentada apresentando valores dos índices da VFC próximo à faixa de normalidade. No entanto tem sido referido que a modulação autonômica da FC passa a ter uma recuperação de seus índices num período de 30 a 60 dias após a angioplastia [27].

Considerando a reperfusão coronariana dos pacientes do presente estudo, a qual foi realizada no primeiro dia de internação e a VFC foi analisada no 2º e o 7º dia, os índices das análises tanto no DT, DF como EnAp foram similares e concordantes com os de Dououlas et al. [28] e Bonnemeier et al. [29] que referem que os índices da VFC não se alteram entre o 1º e o 5º dia.

A redução dos índices da VFC do grupo IAM em relação aos dos voluntários saudáveis, pode ser atribuída as alterações na modulação autonômica no nó sinusal, refletindo em redução da modulação autonômica vagal e incremento da modulação simpática. Estudos prévios referem que as alterações da modulação autonômica da FC após o evento isquêmico cardíaco são decorrentes de modificações nas correntes iônicas através da membrana celular, levando a uma instabilidade elétrica dos miócitos o que promove o aumento do trabalho ventricular e da demanda de oxigênio [25, 27, 30, 31].

É importante notar que em nosso estudo, os valores de BFun (0,79) e BF/AF (3,94) indicam aumento na modulação autonômica simpática dos pacientes após IAM quando comparado aos voluntários saudáveis. Carpeggiani et al. [26] avaliaram a resposta da VFC e observaram maiores valores BF/AF em pacientes com IAM na fase hospitalar ao serem comparados voluntários saudáveis. Do mesmo modo, Barbosa et al. [32] observaram que pacientes com insuficiência cardíaca também apresentam importantes alterações do sistema simpático e parassimpático.

No que se refere aos resultados de EnAp, nosso estudo concorda com Krstacic et al. [4], os quais observaram valores de EnAp entre $0,94 \pm 0,13$ no grupo com IAM. Assim como com os resultados de Acharya et al. [33] que observaram valores de EnAp 1,68 para voluntários saudáveis de meia idade.

As diferenças da EnAp observadas entre os grupos pode ser atribuída ao processo da doença. No IAM, há perda do comportamento caótico (não linear) em favor do comportamento cíclico ou de ausência de variabilidade, que representa maior risco de anormalidade e até mesmo de mortalidade [15].

Este estudo foi limitado pela dificuldade em selecionar uma amostra que atendesse os critérios de inclusão propostos. Estudos mais detalhados com amostras maiores são necessários, bem como estudos transversais que incluem pacientes com IAM e que não recebem terapia betabloqueadora.

Implicações clínicas

Considera-se que a análise da VFC por meio de métodos lineares e não lineares é importante para a compreensão da modulação autonômica cardíaca em situações patológicas, como o IAM.

Assim, com os resultados deste estudo foi possível observar que a VFC, no 2° e no 7° dia do grupo IAM, em uso de betabloqueadores e com reperfusão coronariana, foram semelhantes. Porém, ao compararmos os pacientes após IAM com voluntários saudáveis, observamos que os pacientes com IAM apresentam maior modulação simpática e redução da modulação vagal. A VFC analisada pelos métodos lineares no DT e no DF e o não linear pela EnAp, são concordantes. Isso sugere que tanto o uso de métodos lineares no DT e no DF como os não lineares, como o de EnAp, podem ser empregados para a avaliação da modulação autonômica da FC, tanto de voluntários saudáveis como de pacientes após IAM.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (579408/2008-6; 308348/2009-5; 478601/2010-7) pelo suporte financeiro, às equipes do Hospital dos Fornecedores de Cana de Piracicaba e do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Limeira por permitir o desenvolvimento desta pesquisa. Agradecimento especial ao Dr. Luciano Domingues Dantas e aos pacientes que participaram do estudo.

Referências

- [1] Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation* 1996; 93(5): 1043-1065.
- [2] Makikallio TH, Seppanen T, Niemela M, Airaksinen KE, Tulppo M, Huikuri HV. Abnormalities in beat-to-beat complexity of heart rate dynamics in patients with a previous myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1996; 28: 1005-1011.
- [3] Oliveira DJ, Gomes MED, Guimarães HN, Aguirre LA. Síntese de sinais de variabilidade da frequência cardíaca baseada em modelagem não linear. *Rev Soc Bras Eng Biomédica* 2006; 22(1): 51-62.
- [4] Krstacic G, Krstacic A, Smalcelj A, Milicic D, Gostovic MJ. The chaos theory and nonlinear dynamics in heart rate variability analysis: does it work in short-time series in patients with coronary heart disease? *ANE* 2007; 12(2): 130-136.

- [5] Porta A, Guzzetti S, Montano N, Furlan R, Pagani M, Maliani A, et al. Entropy, Entropy Rate, and Pattern Classification as Tools to Typify Complexity in Short Heart Period Variability Series. *IEEE Trans Biomed Eng* 2001; 48(11): 1282-91.
- [6] Guzzetti S, Borroni E, Garbelli PE, Ceriani E, Della BP, Montano N, et al. Symbolic dynamics of heart rate variability: a probe to investigate cardiac autonomic modulation. *Circulation* 2005; 112(4): 465-70.
- [7] Huikuri HV, Mäkikallio TH, Peng C-K, Goldberger AL, Hintze U, Moller M – DIAMOND Study Group. Fractal Correlation Properties of R-R interval Dynamics and Mortality in Patients With Depressed left Ventricular Function After Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2000; 101: 47-53.
- [8] Stein PK, Domitrovich PP, Huikuri HV, Kleiger RE, Cast Investigators. Traditional and nonlinear heart rate variability are each independently associated with mortality after myocardial infarction. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005; 16: 13–20.
- [9] Wallin BG, Charkoudian N. Sympathetic neural control of integrated cardiovascular function: insights from measurement of human sympathetic nerve activity. *Muscle Nerve* 2007; 36: 595–614.
- [10] Santos-Hiss MDB, Melo RC, Neves VR, Hiss FC, Verzola RMM, Silva E, et al. Effects of progressive exercise during phase I cardiac rehabilitation on the heart rate variability of patients with acute myocardial infarction. *Disabil Rehabil* 2011; 33(10): 835-42.
- [11] Pantoni CB, Di Thommazo L, Mendes RG, Catai AM, Luzzi S, Amaral Neto O, et al. Effects of different levels of positive airway pressure on breathing pattern and heart rate variability after coronary artery bypass grafting surgery. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44(1): 38-45.
- [12] Perseguini NM, Takahashi ACM, Rebelatto JR, Silva E, Borghi-Silva A, Porta A, et al. Spectral and symbolic analysis of the effect of gender and postural change on cardiac autonomic modulation in healthy elderly subjects. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44: 29-37.
- [13] Pincus SM. Approximate entropy as a measure of system complexity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2297-301.
- [14] Pincus SM. Approximate entropy (EnAp) as a complexity measure. *Chaos* 1995; 5(1): 110-117.
- [15] Pincus S. Aproximate Entropy in Cardiology. *Herzschr Elektrophys* 2000; 11: 139-150.
- [16] Piegas LS, Feitosa G, Mattos LA, Nicolau JC, Rossi Neto JM, Timerman A, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST. *Arq Bras Cardiol* 2009; 93(6 supl.2): e179-e264.

- [17] Ruha A, Sallinen S, Nissila S. A real-time microprocessor QRS detector system with a 1-ms timing accuracy for the measurement of ambulatory HRV. *IEE Trans Biomed Eng* 1997; 44(3): 159-67.
- [18] Loimaala A, Sievanen H, Laukkanen R, Parkka J, Vuori I, Huikuri H. Accuracy of a novel real-time microprocessor QRS detector for heart rate variability assessment. *Clin Physiol* 1999; 19: 84–88.
- [19] Gamelin FX, Berthoin S, Bosquet L. Validity of polar S810i heart rate monitor to measure R-R intervals at rest. *Med Sci Sports Exerc* 2006; 38 (5): 887-93.
- [20] Vanderlei LCM, Silva RA, Pastre CM, Azevedo FM, Godoy MF. Comparison of the S810i Polar monitor and the ECG for the analysis of heart rate variability in the time and frequency domains. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41: 854-859.
- [21] Correa PR, Catai AM, Takakura IT, Machado MN, Godoy MF. Heart Rate Variability and Pulmonary Infections after Myocardial Revascularization. *Arq Bras Cardiol* 2010; 95(4): 448-456.
- [22] Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 1991; 84: 482-492.
- [23] Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S, Rimoldi O, Furlan R, Pizzinelli P, et al. A power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Cir Res* 1986; 59: 178-193.
- [24] Beckers F, Verheyden B, Ramaekers D, Swynghedauw B, Aubert AE. Effects of autonomic blockade on non-linear cardiovascular variability indices in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 431–439.
- [25] Lampert R, Ickovics JR, Viscoli CJ, Horwitz RI, Lee FA. Effects of propranolol on recovery of heart rate variability following acute myocardial infarction and relation to outcome in the beta-blocker heart attack trial. *Am J Cardiol* 2003; 91: 137-142.
- [26] Carpeggiani C, L'Abbate A, Landi P, Michelassi C, Raciti M, Macerata A, et al. Early assessment of heart rate variability is predictive of in-hospital death and major complications after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2004; 96: 361–368.
- [27] Soares PPS, Moreno AM, Cravo SLD, Nóbrega ACL. Coronary artery bypass surgery and longitudinal evaluation of the autonomic cardiovascular function. *Critical Care* 2005; 9(2): 124-131.
- [28] Doulalas AD, Tlather MD, Pipilis A, Campbell S, Studart F, Rizos IK, et al. Evolutionary pattern and prognostic importance of heart rate variability during the early phase of acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2001; 77: 169-179.
- [29] Bonnemeier H, Hartmann F, Wiegand UKH, Irmer C, Kurz T, Tolg R, et al. Heart rate variability in patients with acute myocardial infarction undergoing primary coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 2000; 85: 815-820.

- [30] Bigger JT Jr, Fleiss JL, Steinman RC, Rolnitzky LM, Kleiger RE, Rottman JN. Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation* 1992; 85: 164-71.
- [31] La Rovere MT, Bigger JT Jr, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity and heart rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI investigations. *Lancet* 1998; 35(9101): 478-84.
- [32] Barbosa PR, Filho JB, de Sá CRM. Influência da Idade, Sexo e Doença Coronária sobre a Modulação Autonômica do Coração. *Arq Bras Cardiol* 1996; 67(5): 325-29.
- [33] Acharya UR, Kannathal N, Sing OW, Ping LY, Chua T. Heart rate analysis in normal subjects of various age groups. *Biomed Eng Online* 2004; 3(24): 1-8.

3. SEGUNDO MANUSCRITO

Versão em Português

Autores: Vandeni Clarice Kunz, Raquel Bressan de Souza, Anielle Cristhine de Medeiros Takahashi, Aparecida Maria Catai e Ester da Silva

Título: Relação entre a modulação autonômica cardíaca e as características clínicas e angiográficas de pacientes com doença arterial coronariana

Periódico: Manuscrito publicado na Brazilian Journal of Physical Therapy (ANEXO E)

3. SEGUNDO MANUSCRITO

Relação entre a modulação autonômica cardíaca e as características clínicas e angiográficas de pacientes com doença arterial coronariana

3.1. Resumo

Contextualização: A redução da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) é considerada como um importante marcador de disfunção autonômica. **Objetivos:** Avaliar a VFC em pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e compará-los com voluntários saudáveis. **Métodos:** 52 homens (54 ± 5 anos), divididos em três grupos, sendo dois grupos com obstrução coronariana, subdivididos em DAC+ (obstrução $\geq 50\%$, $n=18$) e DAC- (obstrução $<50\%$, $n=17$) e um grupo controle (GC, $n=17$). A frequência cardíaca (FC) foi captada batimento a batimento, a partir do Polar® S810i, em repouso supino durante 15 minutos. A análise da VFC foi pelos cálculos da entropia de Shannon (ES) e padrões da análise simbólica (0V e 2ULV), relacionada a predominância simpática e vagal, respectivamente. Análise estatística: teste de Kruskal-wallis e análise multivariada ($p < 0,05$). **Resultados:** o grupo DAC+ apresentou menores valores de ES e 2ULV e maior 0V quando comparado aos grupos DAC- e CG. Na análise multivariada, foi observado menor ES e maior 0V na presença das características clínicas prévias como infarto e revascularização do miocárdio no grupo DAC+ comparado ao grupo DAC-. O uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina contribuiu para maior ES do grupo DAC- comparado ao DAC+. **Conclusão:** Na DAC+ não complicada, os padrões da VFC apresentam menor complexidade, maior modulação autonômica simpática e menor modulação parassimpática comparativamente ao DAC- e GC em repouso supino. Esses resultados indicam que a disfunção autonômica cardíaca está relacionada ao grau de oclusão coronariana e ao comprometimento cardíaco.

Palavras-chave: Frequência Cardíaca; Doença Arterial Coronariana; Dinâmica Não Linear.

3.2. Introdução

Os fatores de risco fisiológicos e ambientais para o desenvolvimento da doença arterial coronariana (DAC) são bem descritos na literatura e incluem tabagismo, obesidade, sedentarismo, hipertensão arterial, diabetes e hipercolesterolemia. Esses fatores de risco alteram a função autonômica [1-3], e estão associados com a progressão da DAC [4] e aumento da mortalidade na população em geral [5-7]. Esse aumento de risco pode ser resultado da instabilidade elétrica no coração devido a condições de instabilidade autonômica dominada por influências do sistema nervoso simpático [8, 9].

A disfunção do sistema nervoso autonômico cardíaco em pacientes com DAC está relacionada com o grau de obstrução das artérias coronárias, resultando em diminuição da modulação vagal e aumento da modulação simpática [10].

A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) tem sido extensivamente usada para avaliar o balanço do sistema nervoso autônomo. A redução da VFC está associada ao aumento de risco de DAC [4, 11-13].

Convencionalmente, a VFC tem sido analisada no domínio do tempo (DT) e da frequência (DF) a partir de métodos lineares [5, 12]. No entanto, a literatura refere que o comportamento da frequência cardíaca (FC) apresenta-se de maneira não linear, devido aos vários sistemas osciladores que atuam como entrada no sistema nervoso autonômico que, por sua vez, é o modulador da FC [14]. Assim, tem sido proposto analisar a dinâmica da FC por métodos baseados na teoria do Caos [15, 16]. Porta et al. [17] mencionam a análise não linear da dinâmica da FC usando os métodos da Entropia de Shannon (ES), que calcula o grau de complexidade dos padrões dos intervalos RR (iRR). Dessa forma, o estudo da complexidade da regulação cardíaca pode fornecer informações importantes sobre os mecanismos subjacentes de regulação [18]. Assim, uma modificação dos índices de complexidade, pode predizer situação patológica, e depressão global do organismo.

Outro método não linear que vem sendo utilizado para analisar o sistema simpático e o parassimpático é a análise simbólica da sequência de três batimentos

cardíacos, a qual permite promover, separadamente, a porcentagem de atuação de cada um dos ramos do sistema nervoso autônomo cardíaco [19].

Assim, a identificação de alterações no sistema nervoso autônomo de pacientes com DAC, usando os métodos não lineares baseados na ES e na análise simbólica podem ser úteis para a avaliação precoce e estratificação de risco, bem como para monitoramento da vulnerabilidade clínica para novos eventos cardíacos e avaliação e prescrição de exercícios físicos para esses pacientes.

A hipótese desse estudo é que o grau de oclusão coronariana está relacionado com comprometimento da modulação autônoma com redução da complexidade e do balanço simpato-vagal.

O objetivo do estudo foi determinar pela análise da VFC a presença de disfunção autônoma baseada no ES e na análise simbólica em pacientes com DAC e determinar se os padrões da VFC diferem de voluntários saudáveis.

3.3. Métodos

Voluntários

Foram entrevistados e elegidos para o estudo 102 homens com DAC, determinada por angiocoronariografia no Centro de Hemodinâmica do Hospital. Os seguintes critérios de inclusão foram definidos para o estudo: de uma a quatro artérias comprometidas, considerando, artéria descendente anterior, artéria coronária esquerda e direita, artéria circunflexa esquerda, ramos marginais e diagonais. Adicionalmente, a presença de pelo menos um dos seguintes fatores: infarto do miocárdio e angioplastia há mais de 6 meses; cirurgia de revascularização do miocárdio há mais de 12 meses; obesidade (índice de massa corpórea (IMC) entre 30 e 35 kg/m²); tabagismo [20]; etilismo [21]; baixo nível de atividade física semanal, verificada por meio do International Physical Activity Questionnaire (IPAQ), versão 6 [22]; história de hipertensão arterial até o estágio 1 [23]; história de dislipidemias e diabetes *mellitus*.

Foram excluídos voluntários com: arritmias e extrasístoles frequentes (n=5); doença pulmonar obstrutiva crônica (n=6); angioplastia realizada no mesmo dia da angiocoronariografia (n=8); angina instável (n=3); alterações musculares e

articulares (n=5); diabéticos insulino-dependentes (n=6); hipertensão arterial sistêmica no estágio 2 e acima (n=5), neoplasia (n=2), insuficiência renal (n=3), seqüela de acidente vascular cerebral (n=4); que faziam uso de terapia betabloqueadora (n=15) e que não aceitaram participar do estudo (n=5).

Assim, foram estudados 35 homens (55 ± 6 anos) os quais foram divididos em dois grupos de acordo com os resultados da angiocoronariografia em DAC+ (n=18) e DAC- (n=17), com estenose maior e menor que 50%, respectivamente, baseado nas Diretrizes de Doença Coronariana Crônica - Angina Estável [24] e com fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) dentro da normalidade de acordo com a ventriculografia (DAC+= $56,27\pm 5,45$ e DAC-= $64,47\pm 5,83$).

O grupo controle (GC) foi constituído de 17 homens saudáveis (53 ± 4 anos), cujo estado de saúde foi atestado por avaliação clínica completa, incluindo história médica, exame físico, radiografia de tórax, exames bioquímicos de sangue, eletrocardiograma (ECG) de repouso e durante o exercício e medidas da pressão arterial (PA) nas posturas supina e sentada. Não faziam uso de medicamentos e nem eram fumantes ou etilistas.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (protocolo nº 04/09). Todos os voluntários assinaram um termo de consentimento formal, aceitando participar do estudo.

Captação e análise da VFC

Os protocolos foram realizados pelos mesmos profissionais, e sempre no período da tarde para evitar influências do ciclo circadiano sobre as variáveis estudadas. O ambiente era climatizado artificialmente, com a temperatura em torno de 22°C e a umidade relativa do ar entre 40 e 60%. Antes do experimento, os voluntários foram familiarizados com os equipamentos e com o protocolo experimental a fim de reduzir a ansiedade. Os voluntários foram instruídos a não ingerir cafeína ou bebidas alcoólicas e não realizar exercício extenuante 24h antes da aplicação do protocolo, bem como fazer uma refeição leve pelo menos 2h antes do teste.

Para avaliar a modulação autonômica, a FC e os iRR foram captados digitalmente durante 15 minutos, e transferidos para um computador para posterior análise. Os dados foram obtidos antes da angioplastia, usando um frequencímetro Polar Advanced S810i® e um cinto transmissor (*Polar Electro o.Ltda. Kempele, Finland*). Os voluntários foram cuidadosamente instruídos sobre o experimento e a captação da FC foi realizada na presença do pesquisador principal. Todos os voluntários permaneceram na postura supina, em repouso, com as mãos ao lado do corpo. Após um período de repouso, a FC e a pressão arterial (PA) foram mensurados para avaliar se as condições basais dos voluntários estavam dentro da normalidade para dar início ao experimento. A FC e os iRR foram captados a partir de um transmissor conectado ao tórax.

O frequencímetro fornece informações das captações dos iRR, que é definido como o intervalo de tempo entre dois complexos QRS (extensão do ciclo cardíaco). O Polar Advanced S810i detecta as ondas RR do ECG com uma taxa de amostragem de 500hz e resolução temporal de 1ms [25]. Após transferir os dados para o computador, a série dos iRR foi inspecionada e interferências foram eliminadas.

Para análise da VFC, foi utilizado o trecho de maior estabilidade do sinal, considerando 300 pontos consecutivos para todos os voluntários¹². Para análise da VFC, foi utilizado a ES e análise simbólica, os quais foram previamente validados e descritos [17].

Análise simbólica

Esta abordagem, que foi descrita por Porta et al. [17], baseia-se em: 1) transformar uma série de variabilidade do período cardíaco em uma sequência de números inteiros (isto é, símbolos); 2) construir padrões (isto é, palavras); 3) reduzir o número de padrões agrupando-os em um pequeno número de famílias; e 4) avaliar as taxas de ocorrência dessas famílias. Uma abordagem baseada num procedimento de quantização uniforme foi usada para transformar as séries RR numa sequência de símbolos. Explicando de maneira breve, o espectro total da série foi distribuído por símbolos ξ com uma resolução de $(RR_{max}-RR_{min})/\xi$, na qual RR_{max} e RR_{min} eram o máximo e o mínimo da série. Após a quantização, a série

RR se tornou uma sequência $RR_{\xi} = \{RR_{\xi}(i), i=1, \dots, N\}$ de valores inteiros indo de 0 a $\xi-1$. A técnica de retardo coordenado foi utilizada para transformar a série RR_{ξ} em uma sequência de padrões $RR_{\xi,L} = \{RR_{\xi,L}(i), i=L, \dots, N\}$ com $RR_{\xi,L}(i) = [RR_{\xi}(i), RR_{\xi}(i-1), \dots, RR_{\xi}(i-L+1)]$. O número de possíveis $RR_{\xi,L}(i)$ foi ξ^L . Uma vez que ξ^L cresceu muito rapidamente com L e ξ , ambos os parâmetros precisavam ser pequenos. Para aplicações com sequências de dados curtos, o melhor compromisso foi $\xi=6$ e $L=3$, e o número de padrões possíveis foi 216.

Para reduzir o número de padrões sem perder informações, seguimos um procedimento de redução de redundância. Todos os padrões foram agrupados sem perda em quatro famílias, de acordo com o número e os tipos de variação de um símbolo para o outro. As famílias de padrões foram as seguintes: 1) padrões sem variação [0V: todos os símbolos são iguais, por exemplo (4,4,4) ou (2,2,2)]; 2) padrões com uma variação [1V: 2 símbolos consecutivos são iguais e o símbolo restante é diferente, por exemplo (3,4,4) ou (4,4,2)]; 3) padrões com duas variações semelhantes [2LV: os 3 símbolos formam uma rampa ascendente ou descendente, por exemplo (1,2,4) ou (4,3,2)]; e 4) padrões com duas variações contrárias [2ULV: os 3 símbolos formam um pico ou um vale, por exemplo (2,4,2) ou (4,1,2)]. Nós avaliamos as taxas de ocorrência destas famílias, que foram designadas 0V%, 1V%, 2LV%, e 2ULV%. Para computar estes índices, simplesmente contamos o número de vezes que um padrão $R_{\xi=6,L=3}(i)$ pertencente a uma família específica foi encontrado em $RR_{\xi=6,L=3}$. O resultado (multiplicado por 100) foi dividido por $[N-(L-1)]$.

Estudos com bloqueio farmacológico [19] e testes autonômicos indicaram que os índices 0V% e 2ULV% são capazes de avaliar modulações simpáticas e parassimpáticas, respectivamente.

Entropia de Shannon

A distribuição dos padrões foi calculada pela ES para prover uma descrição de sua complexidade. A ES é alta se a distribuição for plana (todos os padrões estão identicamente distribuídos e a série carrega a quantidade máxima de informações). Ao contrário, a ES é baixa se há um provável subconjunto de padrões, enquanto outros são ausentes ou infrequentes (por exemplo, numa distribuição gaussiana) [17, 26].

Análise dos dados

O tamanho da série N foi fixado em 300 batimentos e a média e a variância da série dos iRR foram calculados.

Análise estatística

Para análise dos dados da ES e dos padrões 0V e 2ULV intergrupo foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. A relação da VFC (ES, 0V e 2ULV) com as covariantes: características clínicas (infarto do miocárdio > 6 meses, revascularização o miocárdio > 12 meses, angioplastia > 6 meses, número de artérias e local de estenose), fatores de risco (hipertensão arterial, diabetes *mellitus*, dislipidemia, predisposição familiar para DAC, tabagismo e etilismo) e medicamentos em uso (inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), hipolipemiantes, hipoglicemiantes, diuréticos e antiplaquetários) foi analisada a partir do teste multivariado, modelo tipo III, com post hoc de Bonferroni. Em todas as análises o nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado o aplicativo SPSS 13.0 for Windows e Statistica for Windows, Release 6.1. Stat. Soft, Inc. 2000-2003 para a análise estatística. O cálculo amostral sugeriu no mínimo 14 voluntários para cada grupo, para o nível de significância de 5% (teste bi-caudal) e um *power* de 80% para identificar diferenças entre os grupos para as variáveis ES, 0V e 2ULV.

3.4. Resultados

Características clínicas

A tabela 1 mostra as características basais e os parâmetros cardiovasculares dos voluntários dos três grupos, incluindo os dados de repouso na postura supina de pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) (mmHg), FC (bpm), iRR (ms) e FEVE estimada. Houve diferença significativa entre os grupos DAC+ e GC para a FC ($p < 0,05$). No entanto, não houve diferenças significativas para as demais variáveis ($p > 0,05$).

Dados referentes às características clínicas, fatores de risco e medicamentos em uso dos grupos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 1. Idade, características antropométricas e variáveis cardiovasculares em repouso dos voluntários.

Variáveis	DAC+ n=18	DAC- n=17	GC n=17
Idade (anos)	57±5	52±6	53±4
Massa corporal (kg)	79,81±14,59	78,44±15,68	76,12±6,43
Estatura (m)	1,67±0,07	1,70±0,04	1,73±0,04
IMC (kg/m ²)	28,29±4,52	26,68±4,04	25,19±1,65
PAS (mmHg)	133,33±14,95	121,17±10,53	120±11,18
PAD (mmHg)	84,16±8,08	81,17±7,81	78,23±6,35
FC (bpm)	72,11±7,51*	65,70±8,09	63,11±4,83
Intervalos RR (ms)	890,65±138,91	903,50±136,37	948,32±91,70
FEVE estimada (%)	56,27±5,45	64,47±5,83	--

Média ± DP para as variáveis contínuas

DAC+=pacientes com estenose da artéria coronariana ≥50%; DAC-= pacientes com estenose da artéria coronariana <50%; GC=grupo controle; PAS= pressão arterial sistólica; PAD=pressão arterial diastólica; FC=frequência cardíaca; FEVE=fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

* p < 0,05 (Grupo DAC+ vs GC)

Tabela 2. Dados clínicos e angiográficos, fatores de risco e medicamentos.

Características Clínicas	DAC+ Sim/não	DAC- Sim/não	GC Sim/não
Infarto do miocárdio (>6 meses)	4/14	0/17	0/17
Revascularização do miocárdio (>12 meses)	6/12	0/17	0/17
Angioplastia (>6 meses)	4/14	0/17	0/17
<u>No. artérias comprometidas</u>			
Uniarterial	6/12	11/6	0/17
Biarterial	5/13	6/11	0/17
Multiarterial	7/11	0/17	0/17
<u>Local da estenose</u>			
Descendente anterior	14/4	11/6	0/17
Coronária direita	11/7	6/11	0/17
Circunflexa esquerda	5/13	2/15	0/17
Marginais	7/11	3/14	0/17
Diagonais	7/11	0/17	0/17
<u>Fatores de Risco</u>			
Hipertensão	15/3	6/11	0/17
Diabetes <i>mellitus</i>	9/9	2/15	0/17
Dislipidemia	11/7	8/9	0/17
Predisposição familiar para DAC	9/9	4/13	0/17
Sobrepeso (IMC entre 25 e 30 kg/m ²)	7/11	5/12	5/12
Obesidade (IMC > 30 kg/m ²)	7/11	4/13	0/17
Tabagismo	6/12	3/14	0/17
Etilismo	2/16	3/14	0/17
<u>Medicamentos</u>			
Inibidores da ECA	7/11	6/11	0/17
Hipolipemiantes	10/8	4/13	0/17
Hipoglicemiantes	6/12	2/15	0/17
Diuréticos	6/12	2/15	0/17
Antiplaquetários	16/2	5/12	0/17

DAC+=pacientes com estenose da artéria coronariana ≥50%; DAC-=pacientes com estenose da artéria coronariana <50%; ECA=enzima conversora de angiotensina.

Índices da variabilidade da frequência cardíaca

A ES do grupo DAC+ foi menor comparado ao grupo DAC- e GC (3,28; 3,51 e 3,53, respectivamente, $p < 0,05$) (Figura 1A). O padrão 0V foi menor no GC e no grupo DAC- em relação ao grupo DAC+ (24,74; 26,08 e 31,26, respectivamente, $p < 0,01$) (Figura 1B), e o padrão 2ULV foi menor no grupo DAC+ comparado ao grupo DAC- e GC (12,54; 16,72 e 19,69, respectivamente, $p < 0,05$) (Figura 1C).

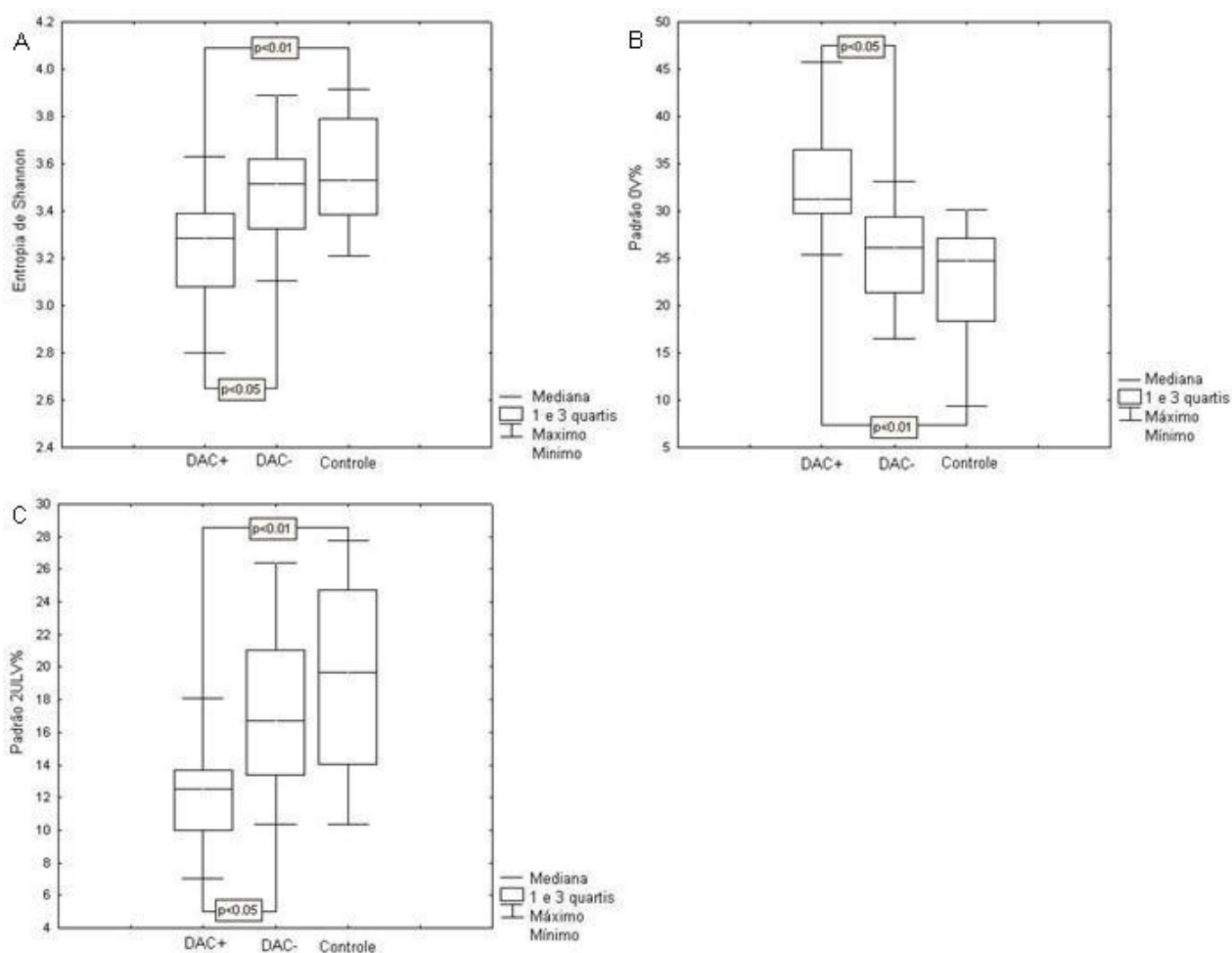


Figura 1: Box plot (mediana, 1º e 3º quartis, máximo e mínimo), mostrando os resultados da entropia de Shannon (1A) e análise simbólica (0V, padrão sem variação (1B) e 2ULV, padrão com duas variações diferentes (1C)), dos grupos DAC+(pacientes com estenose coronariana $\geq 50\%$), DAC- (pacientes com estenose coronariana $< 50\%$) e controle.

Análise Multivariada

Os resultados das médias dos índices ES, 0V e 2ULV da VFC dos grupos DAC+, DAC- e GC relacionado com as variáveis características clínicas, fatores de risco e medicamentos em uso, estão apresentados na tabela 3. Observa-se que os voluntários do grupo DAC+ que com história de infarto e de revascularização do miocárdio apresentam menores valores de ES e maiores valores do padrão 0V quando comparado ao grupo DAC- ($p < 0,05$). No que se refere ao uso de inibidores da ECA, os voluntários do grupo DAC- que faziam uso desse medicamento, apresentam maior ES comparado ao DAC+ ($p < 0,05$). Já o padrão 2ULV, não apresentou relação com as características clínicas, fatores de risco e medicamentos em uso.

Tabela 3. Análise multivariada da média dos índices da ES, 0V e 2ULV da VFC dos grupos DAC+, DAC- e GC, relacionados com as características clínicas, fatores de risco e medicamentos em uso.

Características clínicas	Variáveis		
	ES	0V	2ULV
Infarto do miocárdio (>6 meses)	DAC+<DAC- e GC*	DAC+>DAC- e GC*	ns
Revascularização do miocárdio (>12 meses)	DAC+<DAC- e GC*	DAC+>DAC- e GC*	ns
Angioplastia (>6 meses)	ns	ns	ns
<u>No. artérias comprometidas</u>			
Uniarterial	ns	ns	ns
Biarterial	ns	ns	ns
Multiarterial	ns	ns	ns
<u>Local da estenose</u>			
Descendente anterior	ns	ns	ns
Coronária direita	ns	ns	ns
Circunflexa esquerda	ns	ns	ns
Marginais	ns	ns	ns
Diagonais	ns	ns	ns
<u>Fatores de Risco</u>			
Hipertensão	ns	ns	ns
Diabetes <i>mellitus</i>	ns	ns	ns
Dislipidemia	ns	ns	ns
Predisposição familiar para DAC	ns	ns	ns
Sobrepeso (IMC entre 25 e 30 kg/m ²)	ns	ns	ns
Obesidade (IMC > 30 kg/m ²)	ns	ns	ns
Tabagismo	ns	ns	ns
Etilismo	ns	ns	ns
<u>Medicamentos</u>			
Inibidores da ECA	DAC+<DAC-*	ns	ns
Hipolipemiantes	ns	ns	ns
Hipoglicemiantes	ns	ns	ns
Diuréticos	ns	ns	ns
Antiplaquetários	ns	ns	ns

ES=entropia de Shannon; 0V=padrões sem nenhuma variação; 2ULV=padrões com duas variações diferentes; DAC+=pacientes com estenose da artéria coronariana $\geq 50\%$; DAC-= pacientes com estenose da artéria coronariana $< 50\%$; GC= grupo controle; ECA=enzima conversora de angiotensina; ns= não significativo.

*p < 0,05.

3.5. Discussão

Os resultados desse estudo, baseado na ES e na análise simbólica, indicam a presença de maior disfunção autonômica cardíaca em pacientes com DAC com obstrução $\geq 50\%$ do que em pacientes com DAC com obstrução $< 50\%$ e voluntários saudáveis.

A ES é uma medida da complexidade da distribuição da amostra do sinal [17]. Dessa forma, nossos resultados sugerem que a complexidade da modulação autonômica da FC está relacionada ao grau de comprometimento da obstrução coronariana, uma vez que o grupo DAC+ apresentou uma redução da ES, quando comparado aos grupos DAC- e controle. A redução da ES está relacionada ao desbalanço simpátovagal no coração, que pode predizer situações de depressão global do organismo [18]. Voss et al. [27] observaram um decréscimo dos padrões de ES em pacientes após infarto do miocárdio, o qual está relacionado com o aumento de risco de arritmias malignas e morte cardíaca súbita.

Em nosso estudo, além dos pacientes com DAC+ apresentarem menor ES, os mesmos também apresentaram alterações nos padrões da análise simbólica, com redução do padrão 2ULV e aumento do padrão 0V, em relação aos grupos DAC- e controle. O padrão 0V é caracterizado por ondas lentas (oscilações de BF) enquanto que 2LV e 2ULV são padrões de fragmentos de ondas rápidas (oscilações de AF) [17]. Os padrões simbólicos têm sido associados com a modulação cardíaca simpática e vagal, em estudos prévios, com bloqueio farmacológico e testes autonômicos em populações saudáveis e doentes [19, 26, 28, 29]. O padrão 0V tem sido associado com a modulação simpática enquanto que o padrão 2ULV tem sido associado com a modulação vagal [19, 29]. Portanto, nossos resultados sugerem que os pacientes do grupo DAC+ apresentam um aumento da modulação simpática e redução da modulação vagal, o que está relacionado com a gravidade da oclusão coronariana.

Esses achados são concordantes com estudos prévios, que utilizaram métodos lineares, os quais observaram que a insuficiência coronariana leva a disfunção da modulação autonômica da FC, caracterizada pelo aumento da modulação simpática ou diminuição da modulação vagal [30-32].

A função autonômica anormal é conhecida por predispor arritmias em diversas condições clínicas e em condições experimentais, principalmente diante do estresse físico. Assim, a partir da análise dos índices da VFC pode-se obter informações importantes para o prognóstico de aparecimento de eventos indesejáveis e de mortalidade cardíaca [10, 27].

Pela análise de relação entre as variáveis obtidas da análise da VFC com as características clínicas, fatores de risco e medicamentos em uso, os resultados mostram que os voluntários do grupo DAC+ com história de infarto do miocárdio e revascularização do miocárdio prévia apresentaram maior modulação simpática, comparado ao grupo DAC-. Esse achado reflete que mesmo após 6 meses do período de IAM e 12 meses de revascularização, essas duas características clínicas, são as que mais contribuíram para o aumento da modulação autonômica simpática. Esses achados corroboram com estudos longitudinais que avaliaram pacientes após o IAM [33-35] e após cirurgia de revascularização do miocárdio [36, 37] e observaram que a disfunção autonômica pode estar presente até 12 meses após o evento coronariano.

Verificando a relação da ES com as características clínicas, fatores de risco e medicamentos em uso, foi observado que houve maior valor da ES para os voluntários do grupo DAC- comparado ao grupo DAC+ quando considerados os voluntários que faziam uso de inibidores da ECA, refletindo uma maior complexidade da série de iRR para os voluntários do grupo DAC-. O inibidor da ECA é um medicamento que inibe as funções da angiotensina II, como a vasoconstrição e a atividade simpática [38]. Com isso, esse fármaco permite que ocorra uma recuperação significativa dos índices da VFC, observados por métodos lineares, o que implica em melhora da modulação autonômica da FC e um prognóstico cardiovascular satisfatório [39].

Assim, de modo geral os resultados do presente estudo mostram que pacientes do grupo DAC+, mesmo após a revascularização do miocárdio e o uso de inibidores da ECA, apresentam maior modulação autonômica simpática, sugerindo que os mesmos podem estar mais susceptíveis a desenvolver novos eventos cardiovasculares.

Limitações

Consideramos como limitações deste estudo, a dificuldade em selecionar a amostra que atendesse aos critérios de inclusão propostos. Deve-se considerar também a heterogeneidade dos voluntários estudados, de modo que fatores como infarto e revascularização do miocárdio influenciaram nos resultados encontrados.

Implicações clínicas e práticas

Os resultados do presente estudo mostram que em pacientes com DAC+ há uma redução na complexidade da regulação cardiovascular devido a uma redução da modulação autonômica vagal e aumento da modulação autonômica simpática. Assim, o uso da análise pela ES e simbólica contribui para a identificação de alterações da modulação autonômica da FC permitindo obter informações clínicas sem a necessidade de adição de análises sofisticadas. Além disso, a análise da VFC torna-se relevante tanto para a avaliação precoce e estratificação de risco para doenças cardíacas, bem como para o acompanhamento clínico de pacientes com DAC.

Além disso, a introdução da análise da VFC por meio da ES e da análise simbólica tem como objetivo incentivar a utilização dessa técnica não-invasiva, na área da reabilitação cardíaca, possibilitando avaliar e reavaliar a modulação autonômica da FC antes e após intervenções fisioterapêuticas, desde que seja seguido todas as recomendações e rigor metodológico para coleta e processamento dos dados.

Conclusão

Na DAC não complicada, os parâmetros da VFC mostram menor complexidade da modulação autonômica da FC, maior modulação autonômica simpática e menor modulação autonômica parassimpática, em condições basais. Esses resultados são aceitos como indicador de que a disfunção autonômica do coração está relacionada ao grau de obstrução coronariana. No entanto, são necessários mais estudos envolvendo um número maior de pacientes.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Alberto Porta, por disponibilizar o programa de análise da ES e análise simbólica.

Suporte financeiro: Esse trabalho teve suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (579408/2008-6 de V.C.K. e 308348/2009-5 de E.S.) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (0021058210 de R.B.S).

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse relacionados à publicação desse manuscrito.

Referências

- [1] Mussalo H, Vanninen E, Ikaheimo R, et al. Heart rate variability and its determinants in patients with severe or mild essential hypertension. *Clin Physiol* 2001; 21: 594-604.
- [2] Pehlivanidis AN, Athyros VG, Demitriadis DS, et al. Heart rate variability after long-term treatment with atorvastatin in hypercholesterolaemic patients with or without coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2001; 157: 463-9.
- [3] Vaccarino V, Lampert R, Bremner JD, et al. Depressive symptoms and heart rate variability: evidence for a shared genetic substrate in a study of twins. *Psychosom Med* 2008; 70: 628-36.
- [4] Huikuri HV, Jokinen V, Syvanne M, et al. Heart rate variability and progression of coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1979-85.
- [5] Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, et al. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 1981; 213: 220-2.
- [6] Liao D, Cai J, Rosamond JC, et al. Cardiac autonomic function and incident coronary heart disease: a population-based case-cohort study. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 696-706.
- [7] Tsuji H, Larson MG, Venditti FJ, et al. Impact of reduced heart rate variability on risk for cardiac events: The Framingham Heart Study. *Circulation* 1996; 94: 2850-5.
- [8] Kleiger RE, Miller P, Bigger JT, et al. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1987; 59(4): 256-62.
- [9] Huikuri HV, Makukallio TH. Heart rate variability in ischemic heart disease. *Auton Neurosci* 2001; 90: 95-1001.

- [10] Wennerblom B, Lurje L, Tygesen H, et al. Patients with uncomplicated coronary artery disease have reduced heart rate variability mainly affecting vagal tone. *Heart* 2000; 83(3): 290-4.
- [11] Bigger JT, Fleiss JL, Steinman RC, et al. Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation* 1992; 85: 164-71.
- [12] Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation* 1996; 93(5): 1043-65.
- [13] Novais LD, Sakabe DI, Takahashi ACM, et al. Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca em repouso de homens saudáveis, sedentários e hipertensos e coronariopatas em treinamento físico. *Rev Bras Fisioter* 2004; 8(3): 207-213.
- [14] Signorini MG, Marchetti F, Cerutti S. Applying Nonlinear Noise Reduction in the Analysis of Heart Rate Variability. *IEEE Eng Med Biol Mag* 2001; 20(2): 59-68.
- [15] Goldberger AL, Amaral LAN, Glass L, et al. PhysioBank, PhysioToolkit, and PhysioNet: Components of a New Research Resource for Complex Physiologic Signals. *Circulation* 2000; 101(23): E215-20.
- [16] Freitas U, Roulin E, Muir JF, et al. Identifying chaos from heart rate: The right task? *Chaos* 2009; 19(2): 028505.
- [17] Porta A, Di Rienzo MD, Wessel N, et al. Addressing the complexity of cardiovascular regulation. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 2009; 367(1892): 1215-8.
- [18] Porta A, Guzzetti S, Montano N, et al. Entropy, Entropy Rate, and Pattern Classification as Tools to Typify Complexity in Short Heart Period Variability Series. *IEEE Trans Biomed Eng* 2001; 48(11): 1282-91.
- [19] Guzzetti S, Borroni E, Garbelli PE, et al. Symbolic dynamics of heart rate variability: a probe to investigate cardiac autonomic modulation. *Circulation* 2005; 112(4): 465-70.
- [20] Brasil. Ministério da Saúde. Controle do tabagismo no Brasil. Iglesias R, Jha P, Pinto M, Silva VLC, Godinho J. 2007.
- [21] Gaziano JM, Hennekens C. Royal colleges' advice on alcohol consumption: maintaining existing limits seems justified on current evidence. *Br Med J* 1995; 311(6996): 3-4.
- [22] Hallal PC, Victora CG. Reliability and validity of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ). *Med Sci Sports Exerc*. 2004; 36(3): 556.
- [23] Mion Jr D, Kohlmann Jr O, Machado CA, et al. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol*. 2007; 89(3): e24-79.

- [24] Diretrizes de Doença Coronariana Crônica-Angina Estável. *Arq Bras Cardiol.* 2004; 83, Sup II: 1-43.
- [25] Gamelin FX, Berthoin S, Bosquet L: Validity of Polar S810 Heart Rate Monitor to Measure R-R Intervals at Rest. *Med Sci Sports Exerc* 2006; 38(5): 887–93. 20.
- [26] Takahashi ACM, Porta A, Melo RC, et al. Aging reduces complexity of heart rate variability assessed by conditional entropy and symbolic analysis. *Intern Emerg Med* 2011; DOI: 10.1007/s11739-011-0512-z.
- [27] Voss A, Kurths J, Kleiner HJ, et al. The application of methods of nonlinear dynamics for the improved and predictive recognition of patients threatened by sudden cardiac death. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 419-33.
- [28] Maestri R, Pinna G D, Accardo A, et al. Nonlinear indices of heart rate variability in chronic heart failure patients: redundancy and comparative clinical value. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2007; 18: 425–33
- [29] Porta A, Tobaldini E, Guzzetti S, et al. Assessment of cardiac autonomic modulation during graded head-up tilt by symbolic analysis of heart rate variability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H702–H708.
- [30] La Rovere MT, Bigger Jr JT, Marcus FI, et al. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *Lancet* 1998; 351(9101): 478-84.
- [31] Kuo CD, Chen GY. Comparison of three recumbent positions on vagal and sympathetic modulation using spectral heart rate variability in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1998; 81(4): 392-6.
- [32] Abildstrom SZ, Jensen BT, Agner E, et al. Heart rate versus heart rate variability in risk prediction after myocardial infarction. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003; 14(2): 168-73.
- [33] Binkley PF, Orsinelli DA, Nunziata E, et al. Differing autonomic response to dobutamine in the presence and absence of ischemia: implications for the autonomic contribution to positive inotropic intervention. *Am Heart J* 1995; 130(5): 1054-61.
- [34] Kleiger RE, Stein PK, Bosner MS, et al. Time domain measurements of heart rate variability. In: Malik M, Camm AJ. *New York: Heart rate variability* 1995. 33-45.
- [35] Perkiömäki JS, Hämeikoski S, Junttila MJ, et al. Predictors of long-term risk for heart failure hospitalization after acute myocardial infarction. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2010; 15(3): 250-8.
- [36] Santangeli P, Sgueglia GA, Sestito A, et al. Different effect of percutaneous and surgical coronary revascularization on cardiac autonomic function and inflammation in patients with stable angina. *Int J Cardiol* 2008; 127(2): 269-270.

- [37] Laitio TT, Huikuri HV, Koskenvuo J, et al. Long-term alterations of heart rate dynamics after coronary artery bypass graft surgery. *Anesth Analg* 2006; 102(4): 1026-31.
- [38] Dibner-Dunlap ME, Smith ML, Kinugawa T, et al. Enalapril at augments arterial and cardiopulmonary baroreflex contrl of sympathetic nerve activity in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 358-64.
- [39] Lewandowski J, Abramczyk P, Dobosiewicz A. The effect of enalapril and telmisartan on clinical and biochemical indices of sympathetic activity in hypertensive patients. *Clin Exp Hypertens* 2008; 30 (5): 423-32.

4. TERCEIRO MANUSCRITO

Versão em português

Autores: Vandeni Clarice Kunz, Ana Cristina Silva Rebelo, Rozangela Verlengia, Tarcísio Augusto Gonçalves Nery, Mariana Rodrigues Salviati, Roberta Fernanda Lopes de Paula, Marina Donato Crepaldi, Pedro Ferreira Filho e Ester da Silva

Título: O polimorfismo D/I do gene da ECA não influencia a modulação autonômica da frequência cardíaca de pacientes com doença coronariana

Periódico: Manuscrito submetido ao International Journal of Cardiology (ANEXO F e G)

4. TERCEIRO MANUSCRITO

O polimorfismo D/I do gene da ECA não influencia a modulação autonômica da frequência cardíaca de pacientes com doença coronariana

4.1. Resumo

Contextualização: A influência de fatores genéticos e ambientais na modulação autonômica da frequência cardíaca (FC) ainda é pouco compreendida. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do polimorfismo I/D do gene da ECA na modulação autonômica da FC em pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e sua associação com fatores de risco. **Métodos:** Participaram do estudo 151 pacientes (56 ± 8 anos) com DAC, divididos de acordo com os genótipos para a variante I/D do gene da ECA (rs1799752) (DD, n=54; DI, n=70 e II, n=27). As medidas dos desfechos principais foram a presença dos fatores de risco, os dados de PA, FC e os índices da VFC analisadas a partir da captação da FC e dos intervalos RR (iRR), em repouso na posição supina, durante 15 min. Testes estatísticos: X^2 , one-way ANOVA e regressão linear múltipla com $\alpha=5\%$. **Resultados:** As características basais e fatores de risco não diferiram entre os genótipos ($p > 0,05$). Não houve associação entre o polimorfismo D/I do gene da ECA e as variáveis FC, PA e VFC ($p > 0,05$). Na análise de regressão múltipla, o menor percentual de estenose e o uso de inibidores da ECA, influenciaram 69,24% e 58,40% para maiores índices de RMSSD (ms) e AF (ms^2), respectivamente. **Conclusão:** Os resultados mostram que não há relação entre o polimorfismo D/I do gene da ECA com a FC, PA e VFC. Já os maiores índices da VFC que refletem a modulação autonômica vagal estão relacionados ao menor percentual de estenose e ao uso de inibidores da ECA.

Palavras-chave: variabilidade da frequência cardíaca, doença coronariana, polimorfismo genético, enzima conversora de angiotensina.

4.2. Introdução

A doença arterial coronariana (DAC) é a principal causa de morte nas populações ocidentais e está associada à diversos fatores de risco, que são classificados em modificáveis (tabagismo, hipertensão, etilismo, sedentarismo, entre outros) e não modificáveis (idade, sexo, antecedentes genéticos) [1-3]. Esses fatores de risco estão relacionados com o desenvolvimento e a progressão da DAC [4, 5] e com a disfunção do sistema nervoso autonômico cardíaco [6].

Dentre os fatores genéticos, alterações na sequência nucleotídica do gene que codifica a enzima conversora de angiotensina (ECA) têm sido associadas com risco aumentado de infarto do miocárdio e miocardiopatias [7-10], hipertrofia ventricular esquerda [11], doença arterial coronariana [12, 13] e alterações da modulação autonômica cardíaca, evidenciada a partir da análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) [14, 15].

O polimorfismo do gene da ECA, localizado no intron 16, é caracterizado pela presença (inserção – alelo I) ou ausência (deleção – alelo D) de uma sequência de 287pb. A ECA é responsável por converter angiotensina I em angiotensina II, um importante vasoconstritor, e está envolvida da degradação da bradicinina [16, 17]. Indivíduos portadores de ambos os alelos D (genótipo DD) apresentam maior concentração plasmática de ECA circulante [18].

Estudos apresentam associação do genótipo DD com o aumento dos níveis pressóricos e desenvolvimento da hipertensão arterial (HAS) [19, 20]; o que de acordo com Murphey et al. [17] e Townend [21], pode ser justificado pelos níveis elevados de angioensina II, que exercem ação inibitória vagal e facilitação simpática em nível central e periférico do sistema nervoso, influenciando nas respostas da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial (PA). No que se refere à modulação autonômica da FC, Thayer et al. [15] observaram em indivíduos de meia idade com fatores de risco para DAC, associação do genótipo DD com menor modulação autonômica vagal. Já em pacientes na fase aguda após infarto do miocárdio, não foi verificada associação do genótipo DD com os índices da VFC [14]. No entanto, Busjahn et al. [22] observaram maiores índices de VFC em indivíduos saudáveis portadores do genótipo DD.

Em vista das evidências, os resultados de associação do polimorfismo do gene da ECA com as respostas da modulação autonômica da FC são controversos. Porém, de acordo com o nosso conhecimento, a relação do polimorfismo D/I do gene da ECA com os índices da VFC não foi abordada em uma população com diferentes graus de doença coronariana, em que o paciente já apresenta fatores de risco para a DAC. Assim, com a hipótese de que indivíduos portadores do genótipo DD apresentam maior modulação autonômica simpática e menor modulação vagal, e que fatores de risco para o desenvolvimento da DAC podem estar envolvidos na modulação autonômica da FC, os objetivos foram avaliar a relação entre o polimorfismo D/I do gene da ECA com a FC, PA e os índices da VFC; e avaliar a influência dos fatores de risco sobre os índices da VFC em pacientes com DAC.

4.3. Materiais e métodos

Voluntários

Após assinarem o termo de consentimento informado, 151 pacientes do gênero masculino (56 ± 8 anos) com DAC diagnosticada por angiocoronariografia foram incluídos no estudo. As características basais, clínicas e medicamentos em uso estão apresentados na tabela 1 de acordo com os genótipos da variante D/I do gene da ECA (DD, n=54; DI, n=70 e II, n=27).

Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo os voluntários que apresentaram DAC, de acordo com o diagnóstico médico e com resultados da angiocoronariografia, com percentual de obstrução coronariana (de 20 a 99%) [23], de uma a quatro artérias considerando: artéria descendente anterior, artéria coronária esquerda e direita, artéria circunflexa esquerda, ramos marginais e diagonais; infarto do miocárdio e angioplastia há mais de 6 meses; cirurgia de revascularização do miocárdio há mais de 12 meses; e pelo menos um dos seguintes fatores de risco: obesidade (índice de massa corpórea (IMC), até 35 kg/m^2); tabagismo [24]; etilismo [25]; nível de atividade física semanal, classificado como sedentário ou irregularmente ativo, verificada por meio do International Physical Activity Questionnaire (IPAQ), versão 6 [26]; história de hipertensão arterial até o estágio 1 [27]; de dislipidemia com concentrações plasmáticas elevadas de colesterol total ($>200 \text{ mg/dl}$), de LDL colesterol ($>100 \text{ mg/dl}$),

e de triglicérides (>150mg/dl), ou concentrações reduzidas de HDL (<40mg/dl) [28]; diabetes *mellitus*, níveis de glicemia de jejum >110mg/dl [29].

Foram considerados critérios de exclusão voluntários com: arritmias e extrasístoles frequentes; doença pulmonar obstrutiva; angioplastia realizada no mesmo dia da angiocoronariografia; angina instável; infarto do miocárdio até 6 meses; cirurgia de revascularização até 12 meses; diabéticos insulino-dependentes; hipertensão arterial sistêmica acima do estágio 1; neoplasia; insuficiência renal; seqüela de acidente vascular cerebral; e aqueles que não aceitaram participar do estudo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição sob o nº 04/09. Os voluntários concordaram e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

O tamanho da amostra foi baseado levando-se em consideração a menor frequência genotípica do polimorfismo D/I do gene da ECA (genótipo II) a partir dos dados descritos por Steeds et al. [14]. Foi considerado $p = 0,01$ com margem de erro de 10% e com poder de 80% e com nível de significância de 5%. O cálculo do tamanho da amostra foi processado utilizando-se o BioEstat 5.0, e o número sugerido foi de 38 voluntários.

Procedimento e protocolo experimental

Os dados de FC e PA foram captados entre o 4º e 7º dia após a angiocoronariografia, no Laboratório de Pesquisa da Instituição, em ambiente climatizado artificialmente, com temperatura e umidade relativa do ar em torno de 23°C e 50%, respectivamente. Os voluntários foram instruídos a não ingerir cafeína ou bebidas alcoólicas e não realizar exercício extenuante no dia anterior à aplicação do protocolo. No dia do experimento os voluntários foram questionados sobre o cumprimento das recomendações a seguir, previamente a realização dos protocolos e subsequentemente examinados para a verificação da normalidade dos valores de FC e PA.

Os voluntários permaneceram em repouso na postura supina por um período de 10 min. Durante todo o período de coleta, os voluntários foram orientados a

manter a respiração espontânea com frequência entre 12 e 18 incursões por minuto, sendo esta monitorizada pelo pesquisador. A FC e os intervalos RR (iRR) foram registrados continuamente, batimento a batimento, durante 15 min, utilizando o Freqüencímetro Polar® modelo S810i (Polar ElectroOy, Finland). Esse sistema detecta a despolarização ventricular, correspondente à onda R do eletrocardiograma, com uma taxa de amostragem de 500Hz e uma resolução temporal de 1 ms [30], previamente validado por Loimaala et al. [31] e Gamelin et al [32]. Após a gravação, os sinais foram transmitidos para um receptor de interface conectado a um computador para análise posterior.

A pressão arterial (PA) foi medida em três momentos, na condição de repouso, pelo método auscultatório de Korotkoff por meio de um esfigmomanômetro de coluna de mercúrio (WanMed, São Paulo, SP, Brasil) e um estetoscópio (Littman, St. Paul, MN, USA).

Análise dos dados

Para análise da FC de repouso, foi utilizado o valor médio da coleta de 15 min, e para a PA foi utilizado o valor médio das aferições. Foi realizada uma inspeção visual da distribuição dos iRR (ms) para a seleção dos trechos com maior estabilidade do sinal, retirando-se batimentos ectópicos, considerando-se 300 pontos, para a realização das análises.

A análise da VFC foi realizada a partir de métodos lineares: A) no domínio do tempo, índices temporais RMSSD (Raiz quadrada da somatória do quadrado das diferenças entre os intervalos R-R adjacentes no registro dividido pelo número de intervalos R-R, menos um, expressa em ms); RMSM (Raiz quadrada da somatória do quadrado das diferenças dos valores individuais em relação ao valor médio, dividido pelo número de intervalos R-R do período selecionado [33]. B) no domínio da frequência, por meio de método não paramétrico pela transformada rápida de Fourier dos intervalos R-R previamente selecionados. Pelos componentes do espectro de potência foram obtidas as bandas de muito baixa frequência (MBF=0,003 a 0,04Hz), de baixa frequência (BF=0,04 a 0,15 Hz) e de alta frequência (AF=0,15 a 0,4 Hz) e a razão entre as áreas absolutas de baixa e de alta frequência (razão BF/AF). A normalização foi realizada a partir da divisão da potência absoluta

de um dado componente ms^2 (BF ou AF) pelo espectro de potência total subtraindo o componente de MBF e multiplicado por 100. As bandas AF e BF representam a atuação dos componentes parassimpático e predominantemente simpático no controle da FC, respectivamente [33, 34]. Os dados foram analisados utilizando-se o aplicativo MATLAB 6.5, seguindo-se a rotina para análise da VFC.

Genotipagem (Polimorfismo D/I do gene da ECA – rs1799752)

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de amostras de sangue (5ml) obtidas por punção venosa em tubos a vácuo contendo anticoagulante, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), utilizando o método descrito por Salazar et.al. [35]. Foi utilizado o conjunto de *primers* descrito por Rigat et al. [36], a saber: *sense* 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' e *anti-sense* 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC AGA T-3' cujo produto final de amplificação gera a presença de fragmentos com 490bp e 190bp, para os genótipos I e D, respectivamente e de 490bp e 190bp para o genótipo DI. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi processada em um volume final de 50 μ L contendo 150ng de DNA genômico, 3,0mM de MgCl₂, 200 μ M de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 10pmols de cada *primer*, 0,5U de Taq polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e tampão DNA polimerase 1x (KCl à 50mM, Tris-HCl à 10mM, pH 8,4) (Invitrogen, São Paulo, Brasil). O protocolo da PCR (termociclador T-Gradient, Whatman Biômetra, Goettingen, Alemanha) consistiu de 1 ciclo de desnaturação a 95°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de anelamento a 94°C durante 1 min, 58°C durante 1 min e 72°C durante 1 min e finalmente 1 ciclo de 10 min a 72°C. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose a 1,5% e visualizado sobre luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo. Posteriormente, as amostras classificadas como DD tiveram sua genotipagem confirmada (PCR confirmatório) utilizando-se o conjunto de *primers*: *sense* 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' e *anti-sense* 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3' [18]. Na presença do genótipo DD, nenhum produto de amplificação é observado, enquanto na presença do genótipo DI, um produto de amplificação de 355bp é visualizado. O volume final e as concentrações dos reagentes empregados na reação da PCR foram iguais ao descrito anteriormente com exceção da concentração de MgCl₂ que foi de 2mM. O ciclo de amplificação foi realizado conforme já descrito, com exceção do número de ciclos que foi de 40 e a temperatura de anelamento de 67°C. Os produtos da PCR

foram separados em gel de agarose a 1,5% e visualizado sobre luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo. A confirmação dos genótipos foi realizada a partir de re-análise de 10% das amostras, selecionadas randomicamente.

Análise estatística

As frequências alélicas foram calculadas pelo método de contagem do gene e o teste X^2 foi utilizado para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo com as frequências genotípicas observadas. Para análise das características basais relacionadas à idade, características antropométricas, variáveis cardiovasculares e exames bioquímicos de sangue foi utilizado o teste de one-way ANOVA e para as variáveis dicotômicas relacionadas às características clínicas e fatores de risco foi utilizado o teste X^2 . O teste de one-way ANOVA foi aplicado para verificar a associação entre o polimorfismo D/I com os índices da VFC. A regressão linear múltipla, procedimento *stepwise* [37] foi utilizada para verificar a relação entre os índices da VFC (variáveis dependentes) e as covariantes (variáveis independentes) como: idade, característica genotípica (DD, DI e II), características clínicas (infarto do miocárdio > 6 meses, revascularização do miocárdio > 12 meses, percentual de estenose, número de artérias com estenose), medicamentos em uso de ação no sistema nervoso autônomo cardíaco (betabloqueadores e inibidores da ECA) e fatores de risco para DAC (tabagismo, etilismo, dislipidemia, diabetes *mellitus*, hipertensão e obesidade). As variáveis independentes foram escolhidas por ordem de magnitude do coeficiente de correlação com as variáveis dependentes e sua significância (valor de p). Foi determinado um coeficiente de explicação mínimo de 50% e uma variação de $r^2 < 0,05$. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%. Os dados foram analisados usando o programa estatístico SPSS, versão 13.0, for Windows (Apache Software Foundation).

4.4. Resultados

Frequência genotípica da ECA

Para os 151 pacientes com DAC incluídos no estudo, as frequências dos alelos D e I foram 59% e 41%, respectivamente. A frequência dos genótipos DD, DI e II foram 36% (n=54), 46% (n=70) e 18% (n=27), respectivamente. A frequência dos alelos e dos genótipos está em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($X^2=0,80$; p=0,66).

Características demográficas, clínicas e fatores de risco

As características demográficas e clínicas estão apresentadas na tabela 1. Não houve diferenças para idade e variáveis antropométricas entre os genótipos DD, DI e II ($p > 0,05$) do gene da ECA. Para as variáveis bioquímicas, clínicas, terapia medicamentosa e fatores de risco os valores foram semelhantes entre os diferentes genótipos ($p > 0,05$; Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Características demográficas e clínicas dos genótipos DD, DI e II do gene da ECA.

Variáveis	DD (n=54)	DI (n=70)	II (n=27)	p
Idade (anos)	57±7	55±6	58±7	0,11
Massa corporal (kg)	80,35±12,87	82,44±15,07	83,96±15,95	0,71
Estatura (cm)	170,80±6,49	169,80±6,83	172,15±7,34	0,26
IMC (kg/m ²)	27,34±3,74	28,66±4,92	27,34±4,40	0,35
Exames bioquímicos				
Glicemia (mg/dl)	102,80±32,57	98,87±28,72	97,67±38,85	0,37
Colesterol Total (mg/dl)	179,76±50,00	178,40±37,14	170,89±35,93	0,65
HDL (mg/dl)	38,69±8,25	39,76±10,88	41,00±8,42	0,21
LDL (mg/dl)	110,30±37,81	99,11±25,41	102,63±30,65	0,64
Triglicérides (mg/dl)	152,52±85,01	151,19±75,86	145,00±84,03	0,75
Características Clínicas				
	N (%)	N(%)	N(%)	
Infarto do Miocárdio (>6 meses)	7(13)	7(10)	5(19)	0,54
Revascularização do miocárdio (>12 meses)	3(6)	3(5)	1(4)	0,91
Angioplastia (>6 meses)	7(13)	7(10)	4(15)	0,77
Percentual de estenose				
Estenose ≥50%	30(56)	40(57)	13(48)	0,73
Estenose <50%	24(44)	30(43)	14(52)	0,73
No. de artérias com estenose				
Uniarterial	27(50)	33(47)	12(44)	0,95
Biarterial	12(22)	20(29)	3(11)	0,99
Multiarterial	15(28)	17(24)	12(44)	0,15
Medicamentos				
Betabloqueadores	20(37)	19(27)	7(30)	0,42
Inibidores da ECA	21(39)	19(27)	9(33)	0,38
Hipolipemiantes	22(41)	28(40)	10(37)	0,94
Hipoglicemiantes	4(7)	7(10)	5(19)	0,33
Diuréticos	9(17)	9(13)	6(22)	0,52
Antiplaquetários	31(57)	32(46)	11(41)	0,27

IMC=índice da massa corporal; HDL=lipoproteína de alta densidade; LDL=lipoproteína de baixa densidade; mg/dl=miligramas por decilitro; ECA=enzima conversora de angiotensina. Valores expressos em média e desvio padrão e em número e percentual. Teste one-way ANOVA para dados quantitativos e Teste X² para dados qualitativos.

Tabela 2. Número e percentual de histórico familiar e de fatores de risco para DAC de acordo com os genótipos DD, DI e II do gene da ECA.

	DD (n=54)	DI (n=70)	II (n=27)	p valor
História Familiar	n(%)	n(%)	n(%)	
História familiar para hipertensão	14(26)	21(30)	8(30)	0,87
História familiar para DAC	26(48)	23(33)	8(30)	0,13
História familiar para diabetes	23(25)	37(53)	16(60)	0,22
História familiar para dislipidemia	24(44)	21(30)	6(22)	0,09
História familiar para obesidade	9(17)	14(20)	7(26)	0,61
Fatores de Risco				
Tabagismo	5 (9)	3(4)	4(15)	0,20
Etilismo	24 (44)	29(41)	10(37)	0,81
Dislipidemia	32(59)	43(61)	12(44)	0,30
Diabetes <i>mellitus</i>	14(26)	21(30)	8(30)	0,97
Hipertensão	35(65)	33(47)	11(41)	0,06
Obesidade	8(15)	16(23)	5(19)	0,52

DAC=doença arterial coronariana; Valores de corte: História familiar (presença ou ausência); Valores expressos em número e percentual. Teste X².

Variáveis cardiovasculares

Na tabela 3 estão apresentados os valores de FC, PA e os índices da VFC analisados no domínio do tempo e da frequência, para os genótipos DD, DI e II do gene da ECA. Para todas as variáveis analisadas os valores foram semelhantes entre os três genótipos ($p > 0,05$).

Tabela 3. Polimorfismo D/I do gene da ECA e variáveis cardiovasculares.

		DD (n=54)	DI (n=70)	II (n=27)	p valor
	FC (bpm)	65±10	69±12	67±13	0,23
	PAS (mmHg)	127±12	123±11	122±12	0,07
	PAD (mmHg)	80±6	81±7	80±10	0,75
Domínio do Tempo	RMSSD (ms)	21,73±11,78	20,08±11,43	19,92±19,95	0,68
	RMSM (ms)	29,59±12,09	27,54±13,45	25,25±11,03	0,33
	BF (ms ²)	305,35±335,50	303,33±376,04	208,51±222,92	0,41
Domínio da	AF (ms ²)	190,17±183,22	185,35±191,50	153,16±161,15	0,67
	BF (un)	59,62±21,53	61,47±17,71	57,21±21,52	0,55
Frequência	AF (un)	40,38±21,53	38,49±17,71	42,79±21,52	0,55
	BF/AF	2,27±1,69	2,49±2,47	2,00±1,60	0,58

RMSSD=raiz quadrada da somatória do quadrado das diferenças entre os intervalos R-R no registro dividido pelo número de intervalos R-R em um tempo determinado menos um; RMSM= raiz quadrada da somatória do quadrado das diferenças dos valores individuais em relação ao valor médio, dividido pelo número de intervalos R-R em um período; BF= baixa frequência; AF= alta frequência; BF/AF= razão entre baixa frequência e alta frequência; ms²= unidades absolutas em milisegundos ao quadrado; un= unidades normalizadas; DD= homozigoto para o alelo DD; DI= heterozigoto; II=homozigoto para o alelo I. Valores expressos em media e desvio padrão. Teste one-way ANOVA.

Relação entre os fatores de risco e os índices da VFC

Dentre todas as covariáveis avaliadas com os índices da VFC apenas o menor percentual de estenose e o uso de inibidores da ECA apresentaram relação com os maiores índices de RMSSD (ms) e AF (ms²), com coeficientes de determinação de 69,24 e 58,40%, respectivamente (Tabela 4). Todos os modelos obtidos satisfizeram as hipóteses de homocedasticidade e normalidade dos resíduos.

Tabela 4. Regressão linear entre covariáveis e os índices da variabilidade da frequência cardíaca

	Percentual de estenose			Inibidores da ECA		R ²
	intercepto	estimativa	valor de p	estimativa	valor de p	
RMSSD (ms)	27,69	-10,79	<0,01	11,84	<0,01	69,24%
RMSM (ms)	30,08	-10,55	<0,01	10,31	<0,01	43,11%
BF (ms ²)	177,58	-176,53	<0,01	241,32	<0,01	27,18%
AF (ms ²)	280,35	-158,61	<0,01	194,84	<0,01	58,40%
BF (un)	0,40	0,09	<0,01	-0,07	<0,01	28,59%
AF (un)	0,59	-0,09	<0,01	0,07	<0,01	28,42%
BF/AF	0,92	1,06	<0,01	0,07	<0,01	19,88%

R²=coeficiente de determinação; RMSSD=raiz quadrada da somatória do quadrado das diferenças entre os intervalos R-R no registro dividido pelo número de intervalos R-R em um tempo determinado menos um; RMSM= raiz quadrada da somatória do quadrado das diferenças dos valores individuais em relação ao valor médio, dividido pelo número de intervalos R-R em um período; BF= baixa frequência; AF= alta frequência; BF/AF= razão entre baixa frequência e alta frequência; ms²= unidades absolutas em milisegundos ao quadrado; un= unidades normalizadas. Regressão linear múltipla.

4.5. Discussão

Nossos resultados demonstram não haver associação do polimorfismo D/I do gene da ECA com os fatores de risco para DAC. Além disso, não houve relação entre o polimorfismo D/I da ECA com os níveis de PAS e PAD, FC e com os índices da VFC analisados no domínio do tempo e da frequência. Pela análise de regressão dos índices da VFC com as covariáveis analisadas (características clínicas e fatores de risco) ficou evidenciado que os maiores valores dos índices de RMSSD (ms) e AF (ms²) estão relacionados ao menor grau de estenose coronariana e com o uso de inibidores da ECA.

Estudos prévios, realizados com diferentes populações mostram alta prevalência de fatores de risco em pacientes com genótipo DD e portadores de doenças cardíacas isquêmicas [38-40]. No entanto, nesta investigação não foi possível verificar tal relação, corroborando com outros estudos que não identificaram associação entre o polimorfismo D/I do gene da ECA e os fatores de risco para as coronariopatias [19, 41, 42]. De fato, a presença dos fatores de risco clássicos para DAC é bastante instável, sofrendo influência de componentes ambientais e comportamentais e variando consideravelmente entre populações.

Em nosso estudo, as variáveis PAS e PAD parecem não sofrer influência do polimorfismo D/I do gene da ECA. Cambien et al. [7], Staessen et al. [43] e Lui Li et al. [44] referem que embora o alelo D tem sido considerado um marcador de complicações cardiovasculares ateroscleróticas, em suas investigações, os autores não observaram associação do polimorfismo D/I do gene da ECA com a hipertensão arterial. Por outro lado, Katsuya et al. [19], Mittal et al. [20] e Mastana e Nunn [45] avaliaram a potencial influência do polimorfismo D/I da ECA em pacientes com síndrome metabólica, hipertensos e diabéticos, respectivamente, e observaram que a PAS e PAD foi significativamente maior no genótipo DD quando comparado aos genótipos DI e II. Tais autores atribuem seus achados ao fato de que níveis elevados da ECA, como consequência do genótipo DD, pode resultar em aumento de angiotensina II e subsequente vasoconstrição exacerbada, elevando a PA.

Em nosso estudo, também não foi verificada relação entre o polimorfismo D/I do gene da ECA e as respostas da FC e os índices da VFC, analisado no domínio do tempo e da frequência. O polimorfismo D/I do gene da ECA pode afetar a resposta da FC, porém, sem influenciar intrinsecamente na modulação autonômica da FC. Steeds et al. [14], avaliaram pacientes, em média 30 dias após IAM, e também não encontraram associação do polimorfismo D/I do gene da ECA com os índices da VFC. Ylitalo et al. [46] avaliaram indivíduos jovens saudáveis e também não encontraram relação entre o genótipo DD e os índices de VFC. Alguns estudos indicam que 12 a 65% da variação da VFC podem ser atribuídas à influência do polimorfismo nas respostas do sistema nervoso autonômico cardíaco [22, 47, 48]. Por outro lado, Nikishino et al. [49] encontraram relação do genótipo DD com maiores índices da BF em indivíduos jovens, durante o teste de mudança postural.

Em nosso estudo, a ausência da relação entre o polimorfismo D/I do gene da ECA e a VFC, pode ser parcialmente atribuída à grande variação dos fatores de risco importantes associados como a DAC e que influenciam na modulação autonômica da FC. Além disso, deve-se ressaltar que o grau de comprometimento da doença, o percentual de estenose coronariana, assim como, a terapia medicamentosa tem sido documentado apresentar alta relação com os índices da VFC [50].

Nossos resultados mostram que pela regressão linear foi possível observar que a gravidade da DAC, representada por estenose coronariana $\geq 50\%$, está associada a menores índices de RMSSD e AF. Estes índices representam a modulação autonômica vagal e tais resultados já foram observados em estudos anteriores [50-52]. Assim, o aumento do tônus simpático e a redução do parassimpático podem ser atribuídos ao aumento da demanda do trabalho ventricular e da oferta de oxigênio, causando modificações nas correntes iônicas através da membrana celular. Isso poderia levar a uma instabilidade elétrica dos cardiomiócitos decorrente do grau e do número de artérias com obstrução [53].

Em adição, o uso de medicamentos como inibidores da ECA e beta bloqueadores também influenciam na resposta da VFC, uma vez que tais medicamentos são utilizados para reduzir a demanda de trabalho cardíaco, a PA e a FC, além de reduzir a incidência de novos eventos cardíacos e os índices de mortalidade [54, 55].

Em nosso estudo, observamos que os inibidores da ECA influenciaram significativamente na resposta dos índices RMSSD (ms) e AF (ms^2). Assim a redução da concentração de angiotensina II, promovida pela terapia medicamentosa, estaria influenciando na atividade reflexa dos barorreceptores arteriais, desencadeando principalmente redução da atividade simpática e aumento da atividade vagal [46, 56].

Outro fator a ser considerado é a idade. Estudos prévios verificaram que, com o avanço da idade, ocorre aumento dos níveis de angiotensina II [57]. Sendo assim, a idade associada à presença da doença e ao uso de medicamentos pode ter contribuído para a ausência de relação entre o polimorfismo D/I do gene da ECA e os fenótipos avaliados neste estudo. Estes resultados não excluem a hipótese de que o polimorfismo D/I do gene da ECA possa contribuir com uma parcela da modulação autonômica, explicando em parte um possível mecanismo envolvido na modulação da FC e no controle da PA.

Algumas limitações podem ser observadas, como a ausência de um grupo controle, a não quantificação dos níveis circulantes de ECA e angiotensina II. Além do mais, estudos considerando a avaliação de outros polimorfismos relacionados ao

sistema renina angiotensina, poderiam trazer resultados interessantes, uma vez que fazem parte da mesma via metabólica.

Diante do exposto, os resultados do presente estudo demonstram não haver associação entre o polimorfismo D/I do gene da ECA com os fenótipos de FC, PA e os índices da VFC em pacientes com DAC. Por outro lado, o percentual de estenose e o uso de medicamentos como os inibidores da ECA interferiram na modulação autonômica vagal da FC.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos Drs. Eduardo Nicolela Junior e Humberto Magno Passos por permitirem a triagem dos pacientes, realizar todas as angiocoronariografias e dispor o Centro de Hemodinâmica (Emcor) da Santa Casa de Misericórdia de Piracicaba, para a realização de parte dos experimentos deste trabalho.

Suporte financeiro: CNPq (Processos nº. 579408/2008-6; 308348/2009-5; 478601/2010-7).

Referências

- [1] Talbert RL. Ischemic heart disease. In: DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, eds. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. 6th ed. New York: Elsevier; 2005: 219-250.
- [2] Loos RJ, Katzmarzyk PT, Rao DC, et al. Genome-wide linkage scan for the metabolic syndrome in the HERITAGE Family Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5935–5943.
- [3] Liao D, Sloan RP, Cascio WE, et al. Multiple metabolic syndrome is associated with lower heart rate variability. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes Care* 1998; 21: 2116–2122.
- [4] Huikuri HV, Jokinen V, Syvanne M, et al. Heart rate variability and progression of coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1979-85.
- [5] Liao D, Cai J, Rosamond JC, et al. Cardiac autonomic function and incident coronary heart disease: a population-based case-cohort study. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 696-706.
- [6] Thayer JF, Yamamoto SS, Brosschot JF. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. *Inter J Cardiol* 2010; 141: 122-131.

- [7] Cambien F, Poirier O, Lecerf L, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359: 641-644.
- [8] Raynolds MV, Bristow MR, Bush EW, et al. Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1993; 342: 1073-1075.
- [9] Marian AJ, Yu Q-T, Workman R, Greve G, Roberts R. Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *Lancet* 1993; 342: 1085-1086.
- [10] Petrovic D, Bregar D, Guzic-Salobir B, et al. Sex difference in the effect of ACE-DD genotype on the risk of premature myocardial infarction. *Angiology* 2004; 55: 155–8.
- [11] Schunkert H, Hense H-W, Holmer SR, et al. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 1994; 330: 1634-1638.
- [12] Nakai K, Itoh C, Miura Y, et al. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation* 1994; 90: 2199-2202.
- [13] Unger T. The role of the renin– angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2002; 89: 3A–9A.
- [14] Stedds RP, Fletcher J, Parry H, et al. The angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and heart rate variability following acute myocardial infarction. *Clin Auton Res* 2002; 12: 66-71.
- [15] Thayer JF, Merritt MM, SollersJJ, et al. Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism DD Genotype on High-Frequency Heart Rate Variability in African Americans. *Am J Cardiol* 2003; 92: 1487–1490.
- [16] Cicoira M, Zanolla L, Rossi A, et al. Failure of aldosterone suppression despite angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor administration in chronic heart failure is associated with ACE DD genotype. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1808-12.
- [17] Murphey LJ, Gainer JV, Vaughan DE, Brown NJ. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism modulates the human in vivo metabolism of bradykinin. *Circulation* 2000; 102: 829-32.
- [18] Darrell R. Abernethy, Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl-carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res* 1992; 20:1433.
- [19] Katsuya T, Horiuchi M, Chen YD, et al. Relations between deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and insulin

resistance, glucose intolerance, hyperinsulinemia, and dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 779-782.

- [20] Mittal G, Gupta V, Haque SF, Khan AS. Effect of angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism in patients with metabolic syndrome in North Indian population. *Chin Med J* 2011; 124(1): 45-48.
- [21] Townend JN. Angiotensin II as a modulator of cardiovascular autonomic control. *Cardiologia* 1995; 41(3): 217-225.
- [22] Busjahn A, Voss A, Knoblauch H, et al. Angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms and heart rate variability in twins. *Am J Cardiol* 1998; 81: 755-760.
- [23] Cesar LAM, Dir Mansur AP, Armaganijan D, et al. Diretrizes de Doença Coronariana Crônica-Angina Estável. *Arq Bras Cardiol*. 2004; 83, Sup II: 1-43.
- [24] Iglesias R, Jha P, Pinto M, Silva VLC, Godinho J. Controle do tabagismo no Brasil. Ministério da Saúde, Brasil; 2007.
- [25] Gaziano JM, Hennekens C. Royal colleges' advice on alcohol consumption: maintaining existing limits seems justified on current evidence. *Br Med J* 1995; 311(6996): 3-4.
- [26] Hallal PC, Victora CG. Reliability and validity of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ). *Med Sci Sports Exerc*. 2004; 36(3):556.
- [27] Mion Jr D, Kohlmann Jr O, Machado CA, et al. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol* 2007; 89(3): e24-79.
- [28] Sposito AC, Carameli B, Fonseca FAH, et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose *Arq Bras Cardiol* 2007; 88: 1-19.
- [29] Tambascia MA, Gomes MB, Dib SA, et al. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. 2007; 1-168.
- [30] Ruha A, Sallinen S, Nissila S. A real-time microprocessor QRS detector system with a 1-ms timing accuracy for the measurement of ambulatory HRV. *IEE Trans Biomed Eng* 1997; 44(3): 159-67.
- [31] Loimaala A, Sievanen H, Laukkanen R, Parkka J, Vuori I, Huikuri H. Accuracy of a novel real-time microprocessor QRS detector for heart rate variability assessment. *Clin Physiol* 1999; 19: 84-88.
- [32] Gamelin FX, Berthoin S, Bosquet L. Validity of polar S810i heart rate monitor to measure R-R intervals at rest. *Med Sci Sports Exerc* 2006; 38(5): 887-93.
- [33] Task Force of the European Society of Cardiology, and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur Heart J* 1996; 17: 354-381.

- [34] Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 1991; 84: 482-492.
- [35] Salazar LA, Hirarta MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RD: Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem* 1998; 44 (8 Pt 1): 1748-1750.
- [36] Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, et al. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86(4): 1343–1346.
- [37] Neter J, Wasserman W, Kutner MH, Nachtshein CJ. *Applied Linear Statistical Models*. McGraw Hill 1996; 490p.
- [38] Seckin D, Ilhan N, Ilhan N, Ozbay Y. The relationship between ACE insertion/deletion polymorphism and coronary artery disease with or without myocardial infarction. *Clin biochem* 2006; 39:50-4.
- [39] Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, Channer K, Woods KL. A metaanalysis of the association of the deletion allele of the angiotensin converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation* 1996; 94: 708-12.
- [40] Reddy PB, Babu SBMV, Karunakar KV, et al. Angiotensin-converting enzyme gene variant and its levels: risk factors for myocardial infarction in a South Indian population. *Singapore Med J* 2010; 51(7): 576.
- [41] Pfohl M, Koch M, Prescod S, et al. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism, coronary artery disease and myocardial infarction. *Eur Heart J* 1999; 20: 1318-25.
- [42] Araújo MA, Goulart LR, Cordeiro ER, et al. Genotypic interactions of renin–angiotensin system genes in myocardial infarction. *Inter J Cardiol* 2005; 103: 27-32.
- [43] Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, et al. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens* 1997; 15: 1579-1592.
- [44] Liu LW, Liu H, Chen GL, et al. Angiotensin-converting enzyme gene I/D genotype affected metoprolol-induced reduction in 24-hour average heart rate. *Chin Med J* 2010; 123(11): 1382-1386.
- [45] Mastana S, Nunn J. Angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism is associated with hypertension in a Sikh population. *Hum Hered* 1997; 47: 250-253.
- [46] Ylitalo A, Airaksinen JKE, Hautanen A, et al. Baroreflex sensitivity and variants of the rennin angiotensin system genes. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 194-200.
- [47] Singh JP, Larson MG, O'Donnell CJ, Levy D. Genetic factors contribute to the variance in frequency domain measures of heart rate variability. *Auton Neurosci* 2001; 90: 122–126.

- [48] Uusitalo ALT, Vanninen E, Levalahti E, Battié MC, Videman T, Kaprio J. Role of genetic and environmental influences on heart rate variability in middle-aged men. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H1013-H1022.
- [49] Nishikino M, Matsunaga T, Yasuda K, et al. Genetic variation in the rennin-angiotensin system and autonomic nervous system function in young healthy japonese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4676-4681.
- [50] Kunz VC, Souza RB, Takahashi ACM, Catai AM, Silva E. The relationship between cardiac autonomic function and clinical and angiographic characteristics in patients with coronary artery disease. *Rev Bras Fisioter* 2011; 15(6): 503-510.
- [51] Huikuri HV, Makukallio TH. Heart rate variability in ischemic heart disease. *Auton Neurosci* 2001; 90: 95-1001.
- [52] Vaccarino V, Lampert R, Bremner JD, et al. Depressive symptoms and heart rate variability: evidence for a shared genetic substrate in a study of twins. *Psychosom Med* 2008; 70: 628-36.
- [53] La Rovere MT, Bigger Jr JT, Marcus FI, et al. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *Lancet* 1998; 351(9101): 478-84.
- [54] Dibner-Dunlap ME, Smith ML, Kinugawa T, et al. Enalapril at augments arterial and cardiopulmonary baroreflex control of sympathetic nerve activity in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 358-64.
- [55] Lewandowski J, Abramczyk P, Dobosiewicz A. The effect of enalapril and telmisartan on clinical and biochemical indices of sympathetic activity in hypertensive patients. *Clin Exp Hypertens* 2008; 30(5): 423-32.
- [56] Yu U, Zhang Y, Lui G. Relationship between Polymorphism of the Angiotensin-Converting Enzyme Gene and the Response to Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition in Hypertensive Patients. *Hypertens Res* 2003; 26: 881–886
- [57] Brooks VL, Osborn JW. Hormonal-sympathetic interactions in long-term regulation of arterial blood pressure: an hypothesis. *Am J Physiol* 1995; 268: R1343–R1358.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise da VFC tem sido usada amplamente para a avaliação da condição autonômica cardíaca em diversas condições fisiológicas e fisiopatológicas. Este estudo mostrou resultados relevantes, que refletem o comprometimento da modulação autonômica da FC, com redução vagal e predomínio simpático em pacientes com IAM e com DAC.

Para a análise da VFC têm sido utilizadas várias metodologias tanto lineares como não lineares. Em nosso estudo os métodos lineares no domínio do tempo e da frequência, bem como os não lineares pela EnAp, ES, e análise simbólica foram capazes de detectar alterações da modulação autonômica da FC. A partir desse conhecimento, torna-se importante incentivar a utilização dessa técnica não-invasiva, por profissionais da área da saúde que visam a avaliação da modulação autonômica da FC, na estratificação de risco precoce de doenças cardíacas e na avaliação e reavaliação antes e após intervenções fisioterapêuticas. Assim como, para a avaliação de procedimentos clínicos e medicamentosos de pacientes cardiopatas.

Assim, os resultados aqui apresentados, além de trazer informações técnicas conforme descrito mostra que diante das alterações da modulação autonômica da FC de pacientes com IAM e DAC não complicada, devem ser tomadas medidas preventivas e de intervenção, com o intuito de reduzir os efeitos deletérios gerados pela coronariopatia sobre a modulação autonômica da FC.

6. ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO

6. ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO

Durante o período de realização do Doutorado (2008-2012), tive a oportunidade de participar e colaborar direta ou indiretamente em diferentes atividades vinculadas ou não ao projeto de doutorado. Como desdobramento do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação dos marcadores inflamatórios, polimorfismos genéticos e variáveis cardiovasculares e ventilatórias em pacientes com fatores de risco para doença arterial coronariana” financiado pelo CNPq, ao qual estão vinculados os estudos apresentados nessa tese, e coordenados pela Profa. Dra. Ester da Silva:

- Co-orientei informalmente, a dissertação de mestrado da colega Raquel Bressan de Souza (Título: Análise não linear da modulação autonômica da frequência cardíaca de voluntários de meia idade com doença arterial coronariana e saudáveis)

- Co-orientei a aluna de iniciação científica Vanessa Soliani Celante (Título: Estudo da variabilidade da frequência cardíaca durante a manobra da acentuação da arritmia sinusal respiratória em pacientes com fatores de risco para doença arterial coronariana)

- Co-orientei a aluna de iniciação científica Thamires Cristina da Costa Zanini (Título: Estudo da variabilidade da frequência cardíaca por meio de modelos lineares e não lineares, em pacientes com doença arterial coronariana)

Também participei da elaboração e execução dos projetos “Avaliação dos marcadores inflamatórios, polimorfismos genéticos e variáveis cardiorrespiratórias e metabólicas em pacientes com doença arterial coronariana e/ou fatores de risco submetidos a treinamento físico” que recebeu auxílio financeiro do CNPq, Bolsa Produtividade e “Efeito do treinamento físico sobre as variáveis cardiorrespiratórias e metabólicas em pacientes com diferentes graus de obstrução coronariana”, Edital Universal, coordenado pela Profa Dra Ester da Silva:

- Co-orientei informalmente a dissertação de mestrado da aluna Mariana Rodrigues Salviati (Título: Efeito do treinamento físico em níveis próximos ao limiar de anaerobiose ventilatório sobre os parâmetros cardiorrespiratórios, metabólicos e

bioquímicos na doença arterial coronariana). Um artigo está em fase final de elaboração.

- Co-orientei informalmente a dissertação de mestrado do aluno Tarcisio Augusto Gonçalves Nery (Título: Efeito do treinamento físico intermitente aeróbio sobre a modulação autonômica da frequência cardíaca de pacientes com doença arterial coronariana). Um artigo está em fase final de elaboração.

Além desses projetos, participei em outros projetos, como do PPG-Ft da UFSCAR desenvolvido por: Ana Cristina Silva Rebelo; e do PPG-Ft da UNIMEP desenvolvidos por Marco Antonio dos Santos Carneiro Cordeiro e Roberta Fernanda de Paula Lopes e Nayara Yamada Tamburús.

6.1. Produção técnico científica relaciona às atividades desenvolvidas no período do doutorado

– Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Nery TAG, Kunz VC, Salviati MR, Paula RFLP, Celante VS, Nicolela Jr E, Passos HM, Silva E. A influência da topografia da obstrução coronariana na modulação autonômica da frequência cardíaca (dados parciais) In: XXXII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo; 2011. São Paulo: SOCESP; 2011; 21: 170 – 170.
2. Kunz VC, Verlengia R, Rebelo ACS, Crepaldi M, Cesar MC, Gubolino LA, Camargo TM, Silva E. Associação do polimorfismo I/D do gene da ECA e as variáveis cardiorrespiratórias em homens com doença arterial coronariana e saudáveis In: XXXII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo; 2011. São Paulo: SOCESP; 2011; 21: 169 – 169.
3. Paula RFL, Kunz VC, Nery TAG, Salviati M, Camargo TCM, Cesar MC, Moreno MA, Silva E. Influência dos inibidores da enzima conversora de angiotensina sobre a modulação autonômica da frequência cardíaca In: XXXII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo; 2011. São Paulo: SOCESP; 2011; 21: 169 – 169.
4. Salviati M, Kunz VC, Nery TAG, Paula RFL, Camargo TM, Zamuner AR, Moreno MA, Silva E. Relação entre os marcadores inflamatórios e a modulação autonômica da frequência cardíaca em homens com DAC In: XXXII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo; 2011. São Paulo: SOCESP; 2011; 21: 169 – 169.
5. Celante VS, Kunz VC, Souza RB, Salviati M, Nery TAG, Paula RFL, Moreno MA, Camargo TM, Silva E. Arritmia sinusal respiratória em homens com doença arterial coronariana In: XVII Simpósio de Fisioterapia da UFSCAR e VII Encontro de ex-alunos da UFSCAR; 2010. São Carlos. XVII Simpósio de Fisioterapia da UFSCAR; 2010.

6. Souza RB, Kunz VC, Camargo TM, Salviati M, Celante VS, Tamburus NY, Rebelo ACS, Gubolino L A, Moreno MA, Silva E. Avaliação da modulação autonômica da frequência cardíaca de homens de meia idade com doença arterial coronariana e saudáveis. In: XXXI Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo; 2010. São Paulo: SOCESP; 2010; 20: 157 – 157.
7. Camargo TM, Kunz VC, Souza RB, Silva E, Celante VS, Zamuner AR, Salviati M, Paula RFL, Gubolino LA, Moreno MA. Relação entre a função pulmonar e proteína c-reativa ultra sensível em sujeitos com doença arterial coronariana. In: XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental; 2010. Águas de Lindóia-SP: FESBE; 2010.
8. Kunz VC, Souza RB, Camargo TM, Salviati M, Paula RFL, Celante VS, Crepaldi M, Gubolino LA, Moreno MA, Silva E. Relação entre a proteína C-reativa e a modulação autonômica da frequência cardíaca em sujeitos com doença arterial coronariana. In: XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental; 2010. Águas de Lindóia-SP: FESBE; 2010.
9. Kunz VC, Serra KBS, Borges EN, Rebelo ACS, Serra PES, Gubolino LA, Dantas L D, Moreno MA, Silva E. Análise da inclinação VE/VCO₂ e da capacidade funcional aeróbia em pacientes acometidos por infarto agudo do miocárdio In: XXX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo; 2009. São Paulo: SOCESP; 2009; 19: 142 – 142.
10. Souza RB, Kunz VC, Rebelo ACS, Tamburus NY, Facirolli K, Moreno MA, Silva E. Análise da modulação autonômica da frequência cardíaca (FC) a partir da arritmia sinusal respiratória em homens com doença arterial coronariana (DAC) e saudáveis. In: XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental; 2009. Águas de Lindóia-SP: FESBE; 2009.
11. Kitamura JH, Zamuner AR, Borges EN, Kunz VC, Silva E, Moreno MA. Influência do infarto agudo do miocárdio na função pulmonar. In: XVIII Congresso Brasileiro de Fisioterapia; 2009. Rio de Janeiro; 2009.
12. Kunz VC, Rebelo ACS, Souza RB, Tamburus NY, Serra KBS, Serra PES, Gubolino LA, Salviati M, Moreno MA, Silva E. Slope VE/VCO₂ e capacidade funcional aeróbia em homens acometidos por infarto agudo do miocárdio e saudáveis In: XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental; 2009. Águas de Lindóia-SP: FESBE; 2009.
13. Serra KBS, Kunz VC, Rebelo ACS, Serra PES, Zuttin RS, Silva E. A influência da terapia betabloqueadora sobre as respostas cardiorrespiratórias durante teste ergoespirométrico em homens infartados: análise comparativa com saudáveis sedentários - resultados preliminares In: XXIX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo; 2008. São Paulo: SOCESP; 2008; 18: 159 – 159.
14. Kunz VC, Serra KBS, Borges EN, Rebelo ACS, Zuttin RS, Coelho RC, Silva E. A variabilidade da frequência cardíaca difere entre pacientes com infarto agudo do miocárdio e saudáveis sedentários? In: XXIX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo; 2008. São Paulo: SOCESP; 2008; 18: 163 – 163.
15. Borges EN, Kunz VC, Serra KBS, Zuttin RS, Moreno MA, Silva E. Avaliação da função

pulmonar e da fração de ejeção ventricular (FEVE) de homens após infarto agudo do miocárdio In: XXIX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo; 2008. São Paulo: SOCESP; 2008; 18: 168 – 168.

16. Kunz VC, Serra KBS, Borges EN, Rebelo ACS, Zuttin RS, Tamburus NY, Souza RB, Moreno MA, Serra PES, Gubolino LA, Merino NA, Dantas LD, Silva E. Comparative analysis of cardiopulmonary responses of healthy sedentary men and men after acute myocardial infarction In: VII Workshop em Fisiologia do Exercício da UFSCar e I International Meeting in Exercise Physiology; 2008. São Carlos. Suplemento International Journal of Exercise Science 2008; 1: 88 – 88.

- Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. Salviati M, Nery TAG, Kunz VC, Paula RFL, Silva E. Avaliação da modulação autonômica da frequência cardíaca em pacientes com doença arterial coronariana usuários de betabloqueadores In: 8º Congresso de Pós Graduação e Mostra Acadêmica da Universidade Metodista de Piracicaba; 2010. Piracicaba. UNIMEP; 2010.
2. Camargo TM, Silva E, Kunz VC, Souza RB, Salviati M, Celante VS, Zamuner AR, Nery TAG, Moreno MA. Influência do treinamento físico aeróbico sobre a pressão arterial sistêmica de sujeitos com doença arterial coronariana In: 8º Congresso de Pós Graduação e Mostra Acadêmica da Universidade Metodista de Piracicaba; 2010. Piracicaba. UNIMEP; 2010.
3. Souza RB, Kunz VC, Camargo TM, Salviati M, Gubolino LA, Celante VS, Moreno MA, Silva E. Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca a partir da arritmia sinusal respiratória em homens de meia idade com doença arterial coronariana In: 7º Congresso de Pós Graduação e Mostra Acadêmica da Universidade Metodista de Piracicaba; 2009. Piracicaba. UNIMEP; 2009.

6.2. Produção técnica científica não vinculada ao doutorado

- Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Zuttin RS, Rebelo ACS, Moreno MA, Tamburus NY, Kunz VC, Souza RB, Catai AM, Silva E. A modulação autonômica da frequência cardíaca difere das mulheres jovens, na pré-menopausa e na pós-menopausa? In: XXXI Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo; 2010. São Paulo: SOCESP; 2010; 20: 123 – 123.
2. Salviati M, Tamburus NY, Rebelo ACS, Kunz VC, Souza RB, Celante VS, Silva E. Avaliação da modulação autonômica da frequência cardíaca por meio da análise simbólica em mulheres usuárias ou não de contraceptivos orais In: XXXI Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo; 2010. São Paulo: SOCESP; 2010; 20: 156 – 156.
3. Rebelo ACS, Tamburus NY, Kunz VC, Salviati M, Paula RFL, Hirata, RDC, Verlengia R, Silva E. Relação entre o polimorfismo do gene ERS-97T>C e a modulação autonômica da frequência cardíaca em mulheres fisicamente ativas e sedentárias In: XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental; 2010. Águas de Lindóia-SP: FESBE; 2010.

4. Salviati M, Pereira A, Rebelo ACS, Zuttin RS, Zamuner AR, Tamburus NY, Souza RB, Kunz VC, Moreno MA, Silva E. A influência da atividade física sobre a modulação autonômica da frequência cardíaca de mulheres jovens In: 16 Simpósio de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos; 2009. São Carlos. Suplemento Fisioterapia Brasil - XVI Simpósio de Fisioterapia da UFSCAR; 2009; 10: 11 – 11.
5. Rebelo ACS, Zuttin RS, Tamburus NY, Kunz VC, Cordeiro MASC, Hirata RDC, Verlengia R, Silva E. Polimorfismo do gene ERS1-351A>G e sua relação com capacidade funcional aeróbica em usuárias de contraceptivos orais monofásicos combinados. In: XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental; 2009. Águas de Lindóia-SP: FESBE; 2009.
6. Cordeiro MASC, Rebelo ACS, Kunz VC, Tamburus NY, Souza RB, Silva E, Verlengia R. Relação do polimorfismo I/D do gene da ECA com a capacidade funcional aeróbica de mulheres ativas: resultados preliminares In: 32 Simpósio Internacional de Ciências do Esporte; 2009. São Paulo: 32 Simpósio Internacional de Ciências do Esporte; 2009.
7. Zuttin RS, Rebelo ACS, Catai AM, Moreno MA, Tamburus NY, Souza RB, Santos MCS, Kunz VC, Salviati M, Pereira A, Zamuner AR, Sakabe DI, Neves VFC, Silva E. Relationship of age and the autonomic modulation of heart rate (HR) between women In: 8 th European Congress on Menopause (EMAS); 2009. London: 8 th European Congress on Menopause (EMAS); 2009: 16 – 20.
8. Rebelo ACS, Kunz VC, Zuttin RS, Moreno MA, Tamburus NY, Coelho RC, Souza RB, Verlengia R, Silva E. Uso de contraceptivos orais da terceira geração e sua influência sobre a modulação autonômica da frequência cardíaca: análise por modelos lineares e não-lineares In: XXX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo; 2009. São Paulo: SOCESP; 2009; 19: 153 – 153.
9. Zuttin RS, Rebelo ACS, Santos, MCS, Neves, VFC, Pereira A, Kunz VC, Catai AM, Cesar MC, Silva E. As respostas cardiorrespiratórias e metabólicas no pico do exercício e no nível do limiar de anaerobiose diferem entre mulheres jovens, na pré-menopausa e na menopausa? In: XXIX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo; 2008. São Paulo: SOCESP; 2008; 18: 162 – 162.
10. Tamburus NY, Barcaui, AL, Grassi DO, Zuttin RS, Souza RB, Curaca ICB, Facirolli K, Kunz VC, Rebelo ACS, Moreno MA, Silva E. Evaluation of proprioceptive neuromuscular facilitation technique by the Kabat method on functional aerobic capacity of sedentary men In: VII Workshop em Fisiologia do Exercício da UFSCar e I International Meeting in Exercise Physiology; 2008. São Carlos: Suplemento International Journal of Exercise Science; 2008; 1: p.92 – 92.
11. Rebelo ACS, Zuttin RS, Kunz VC, Tamburus NY, Souza RB, Degaspari B, Cesar MC, Moreno MA, Pereira A, Salviati M, Zamuner AR, Curaca ICB, Cordeiro MASC, Verlengia R, Silva E. The influence of oral contraceptives of ethinyl estradiol combined with getodene or desogestrel on cardiorespiratory responses In: VII Workshop em Fisiologia do Exercício da UFSCar e I International Meeting in Exercise Physiology; 2008. São Carlos: Suplemento International Journal of Exercise Science; 2008; 1: 26 – 26.
12. Rebelo ACS, Cordeiro MASC, Souza RB, Tamburus NY, Zuttin RS, Pereira A, Curaca ICB, Salviati M, Zamuner, AR, Kunz, VC, Moreno MA, Verlengia R, Silva E. Uso de contraceptivos orais e sua associação entre o polimorfismo do gene -97T>C e a capacidade funcional aeróbica In: XI São Paulo Research Conference; 2008. São Paulo:

Medicina Molecular e Farmacogenética; 2008; 1: 31 – 31.

- Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. Cordeiro MASC, Rebelo ACS, Kunz VC, Tamburus NY, Salviati M, Silva E, Verlengia R. Associação do polimorfismo I/D do gene da ECA com variáveis cardipulmonares de mulheres ativas In: 7º Congresso de Pós Graduação e Mostra Acadêmica da Universidade Metodista de Piracicaba; 2009. Piracicaba. UNIMEP; 2009
2. Tamburus NY, Rebelo ACS, Zuttin RS, Salviati M, Celante VS, Zamuner AR, Souza RB, Kunz VC, Silva E. Avaliação da resposta da frequência cardíaca de recuperação após o teste ergoespirométrico em mulheres ativas e sedentárias In: 7º Congresso de Pós Graduação e Mostra Acadêmica da Universidade Metodista de Piracicaba; 2009. Piracicaba. UNIMEP; 2009.
3. Zuttin RS, Rebelo ACS, Santos MCS, Salviati M, Zamuner AR, Pereira A, Sakabe DI, Neves VFC, Moreno MA, Tamburus NY, Souza, RB, Kunz VC, Silva E. Análise da Modulação Autonômica da Frequência Cardíaca em mulheres na fase reprodutiva e na pós-menopausa In: 6º Congresso de Pós Graduação e Mostra Acadêmica da Universidade Metodista de Piracicaba; 2008. Piracicaba. UNIMEP; 2008.

- participação em bancas de graduação

1. Kunz VC. Participação em banca de Daniella da Silva Oliveira. Comparação da capacidade funcional, qualidade de vida e nível de atividade física entre tabagistas e fumantes passivos, 2011, (Fisioterapia) Faculdade Anhanguera de Piracicaba
2. Kunz VC, Borges EN. Participação em banca de Patrícia Aparecida Vinco e Viviane Campos. A eficácia da Estimulação Elétrica Nervosa (TENS) nas pressões respiratórias em pós-operatória de cirurgia cardíaca, 2009 (Fisioterapia) Faculdades Integradas Einsten de Limeira
3. Kunz VC, Rebelo ACS. Participação em banca de Diego Felipe C de Oliveira. Ginástica Laboral para o desenvolvimento da flexibilidade, 2009, (Educação Física) Universidade Metodista de Piracicaba
4. Kunz VC, Urtado CB. Participação em banca de Mauricio Moura Lucio e Tiago Rafael Giovanetti. Os efeitos do exercício físico em indivíduos coronariopatas, 2009, (Educação Física) Universidade Metodista de Piracicaba
5. Kunz VC, BalthazaR E. Participação em banca de João Rafael Storoli e Eduardo Danelon de Toledo. Os efeitos do exercício físico nas variáveis antropométricas em adolescentes obesos, 2009, (Educação Física) Universidade Metodista de Piracicaba
6. Kunz VC, Pellegrinotti ÍL, Grecco CC, Participação em banca de Telma Queiróz de Almeida. Benefícios da musculação para mulheres, 2008, (Educação Física) Universidade Metodista de Piracicaba.
7. Kunz VC, Rebelo ACS, Silva E. Participação em banca de Andressa Pereira e Mariana Rodrigues Salviati. Influencia da atividade física sobre a modulação autonômica da frequência cardíaca em mulheres jovens, 2008, (Fisioterapia) Universidade Metodista de Piracicaba
8. Kunz VC, Alves SCC, Cardoso GA. Participação em banca de Cintia Beatriz Boldrin e

Rosana N. Magalhães. Obesidade na adolescência e a importância da prática de Educação Física, 2008, (Educação Física) Universidade Metodista de Piracicaba

- Atividades diversas

(Auxílio na preparação de artigos científicos)

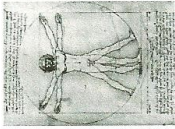
1. Vandeni Clarice Kunz, Karina Beatriz Silva Serra, Erica Nicolau Borges, Pauo Eduardo Seade Serra, Ester da Silva. Teste cardiopulmonar na fase precoce do infarto do miocárdio para a prescrição de treinamento físico. *Brazilian Journal of Physical Therapy*, 2012.
2. Ana Cristina Silva Rebelo; Rozangela Verlengia; Vandeni Clarice Kunz; Nayara Yamada Tamburús; Rosario Dominguez Crespo Hirata; Marco Antônio dos Santos Carneiro Cordeiro; Ester da Silva. Association of ACE insertion/deletion polymorphism and cardioventilatory variables in aerobic and strength training women. Submetido à *European Journal of Applied Physiology*, 2011.
3. Ana Cristina Silva Rebelo, Rozangela Verlengia, Vandeni Clarice Kunz, Rosario Domingues Crespo Hirata, Alvaro Cerda, Marcos Felipe Silva de Sá, Mario Hirata, Nayara Yamada Tamburus, Ester da Silva. Association of estrogen receptor- α gene polymorphisms with autonomic modulation of heart rate in young women. Submetido à *Steroids*, 2011.
4. Vandeni Clarice Kunz, Mariana Rodrigues Salviati, Tarcisio Augusto Gonçalves Nery, Roberta Fernanda de Paula Lopes, Eduardo Nicolela Jr, Humberto Magno Passos e Ester da Silva. Relação entre a modulação autonômica cardíaca vagal e a proteína c-reativa em pacientes com doença arterial coronariana. Artigo em preparação

Prêmios recebidos:

1. 2º Lugar Apresentação de Temas Livres do Departamento de Fisioterapia do XXXII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. (Associação do polimorfismo I/D do gene da ECA e as variáveis cardiorrespiratórias em homens com doença arterial coronariana e saudáveis, 2011)
2. 1º Lugar na categoria Profissional na apresentação de tema livre da V Jornada Catarinense de Fisioterapia Cardiorrespiratória, UNOESC e ASSOBRAFIR (Estudo da variabilidade da frequência cardíaca em homens após o infarto agudo do miocárdio).

ANEXO A

Parecer 63/06 do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Metodista de Piracicaba



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "*Intervenção fisioterapêutica e terapia betabloqueadora em pacientes com infarto no miocárdio*", sob o protocolo nº 63/06, da Pesquisadora *Profa Dra Ester da Silva*, está de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/1996, tendo sido aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa – UNIMEP.

We certify that the research project with title "*Physiotherapeutic intervention and beta-blocker therapy in patients with myocardial infarction*", protocol nº 63/06, by Researcher *Dra Ester da Silva*, is in agreement with the Resolution 196/96 from Conselho Nacional de Saúde/MS and was approved by the Ethical Committee in Research at the Methodist University of Piracicaba – UNIMEP.

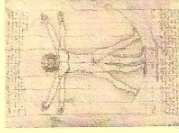

Prof. Ms. Rodrigo Batagello
Secretário
CEP – UNIMEP

Piracicaba, May, 30, 2007.


Prof. Dra Teima Regina de Paula Souza
Coordenadora
CEP - UNIMEP

ANEXO B

Parecer 04/09 do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Metodista de Piracicaba




CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação dos marcadores inflamatórios, polimorfismos genéticos e variáveis cardiovasculares e ventilatórias em pacientes com fatores de risco para doença arterial coronariana**" do protocolo nº. **04/09**, da Pesquisadora **Profa. Dra. Ester da Silva**, está de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/1996, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – UNIMEP.

We certify that the research project with title "**Evaluation inflammatory markers, genetic polymorphisms and ventilatory and cardiovascular variables in patients with risk factors for coronary artery disease**", protocol nº. **04/09**, by Researcher **Profa. Ester da Silva**, is in agreement with the Resolution 196/96 from Conselho Nacional de Saúde/MS and was approved by the Ethical Committee in Research at the Methodist University of Piracicaba – UNIMEP.

Piracicaba, SP, Brazil, 29, april, 2009.


Prof.ª, Dra.ª, Telma Regina de P. Souza
Coordenadora CEP - UNIMEP

ANEXO C

Comprovante do aceite de publicação do *manuscrito* “*Linear and nonlinear analysis of heart rate variability in healthy subjects and postacute myocardial infarction patients*” no Brazilian Journal of Medical and Biological Research

[BJMBR-1511] Editorial Review of Article - Accept

DE: Sistema SciELO de Publicação

PARA: Vandeni Clarice Kunz

Segunda-feira, 9 de Janeiro de 2012 9:24

Corpo da mensagem

BJMBR 1511 - Linear And Nonlinear Analysis Of Heart Rate Variability In Healthy Subjects And Post Acute Myocardial Infarction Patients

V.C. Kunz, E.N. Borges, R.C. Coelho, LA. Gubolino; L.E.B. Martins; E. Silva

Prezada Dra. Ester da Silva,
esilvas@unimep.br, vandenikunz@yahoo.com.br

Temos a satisfação de informar que seu trabalho foi aceito para publicação no Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

O trabalho está sendo verificado e preparado pelo Editor de Estilo, e se necessário o texto corrigido e eventuais questões serão enviadas à V.Sa. via e-mail, antes da preparação do provisional e da prova gráfica.

O processo de publicação do trabalho depende do pagamento da page charges, portanto precisamos das informações abaixo, o mais rapidamente possível.

Contamos com sua compreensão e colaboração. POR FAVOR ACUSE O RECEBIMENTO DESTE EMAIL.

Atenciosamente,

Dr. Lewis Joel Greene

Dr. José Antunes Rodrigues

Dr. João Batista Calixto

Editores

Brazilian Journal of Medical and Biological Research

bjournal@terra.com.br

<http://www.bjournal.com.br>

ANEXO D

Manuscrito "*Linear and nonlinear analysis of heart rate variability in healthy subjects and post acute myocardial infarction patients*" aceito para publicação no Brazilian Journal of Medical and Biological Research

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance.
Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

Linear and nonlinear analysis of heart rate variability in healthy subjects and after acute myocardial infarction in patients

V.C. Kunz¹, E.N. Borges², R.C. Coelho³, L.A. Gubolino⁴, L.E.B. Martins⁵ and E. Silva^{1,2}

¹Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular, Núcleo de Pesquisa em Exercício Físico, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

²Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, SP, Brasil

³Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de São Paulo, São José dos Campos, SP, Brasil

⁴Unidade Coronariana do Hospital dos Fomecedores de Cana de Piracicaba, Piracicaba, SP, Brasil

⁵Faculdade de Educação Física, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

Abstract

The objectives of this study were to evaluate and compare the use of linear and nonlinear methods for analysis of heart rate variability (HRV) in healthy subjects and in patients after acute myocardial infarction (AMI). Heart rate (HR) was recorded for 15 min in the supine position in 10 patients with AMI taking β -blockers (aged 57 ± 9 years) and in 11 healthy subjects (aged 53 ± 4 years). HRV was analyzed in the time domain (RMSSD and RMSM), the frequency domain using low- and high-frequency bands in normalized units (nu; LFnu and HFnu) and the LF/HF ratio and approximate entropy (ApEn) were determined. There was a correlation ($P < 0.05$) of RMSSD, RMSM, LFnu, HFnu, and the LF/HF ratio index with the ApEn of the AMI group on the 2nd ($r = 0.87, 0.65, 0.72, 0.72, \text{ and } 0.64$) and 7th day ($r = 0.88, 0.70, 0.69, 0.69, \text{ and } 0.87$) and of the healthy group ($r = 0.63, 0.71, 0.63, 0.63, \text{ and } 0.74$), respectively. The median HRV indexes of the AMI group on the 2nd and 7th day differed from the healthy group ($P < 0.05$): RMSSD = 10.37, 19.95, 24.81; RMSM = 23.47, 31.96, 43.79; LFnu = 0.79, 0.79, 0.62; HFnu = 0.20, 0.20, 0.37; LF/HF ratio = 3.87, 3.94, 1.65; ApEn = 1.01, 1.24, 1.31, respectively. There was agreement between the methods, suggesting that these have the same power to evaluate autonomic modulation of HR in both AMI patients and healthy subjects. AMI contributed to a reduction in cardiac signal irregularity, higher sympathetic modulation and lower vagal modulation.

Key words: Myocardial infarction; Heart rate variability; Autonomic nervous system; Spectral analysis; Nonlinear dynamics

Introduction

The integrity of autonomic modulation of heart rate (HR) is evaluated by analyzing heart rate variability (HRV), which refers to oscillations in the intervals between consecutive heartbeats, or R-R intervals (RRi) (1). This method for evaluation is employed in a variety of clinical applications, being extensively used in cardiology due to its noninvasiveness, ease of application and high reproducibility (1,2).

It has been well established that autonomic HR regulation is associated with the integrity of complex interactions between electrophysiological, humoral and hemodynamic variables (2,3). However, HR is considered to present nonlin-

Correspondence: E. Silva, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, km 235, 13565-905 São Carlos, SP, Brasil. Fax: +55-16-3361-2081. E-mail: esilvas@unimep.br or vandenikunz@yahoo.com.br

Received September 7, 2011. Accepted February 7, 2012. Available online March 2, 2012.

ear behavior due to the complex interaction between several systems (central nervous system, reflex mechanisms and neurohumoral factors) (3-7).

The literature indicates that linear methods have been widely explored and are considered to be appropriate for the study of HRV (8-12). Nevertheless, interest in nonlinear methods has increased in recent years (4-7,13-15) due to observations that HR fluctuation is subordinate to autonomic nervous system control of cardiac activity and vascular dynamics (14), which suggests that the mechanisms involved in cardiovascular regulation interact with and have repercussions on other organs.

Among nonlinear methods, approximate entropy (ApEn) allows the evaluation of regular time series and is used to analyze physiological and clinical data (13,14). Thus ApEn provides quantitative information about the complexity of or reduction in the chaotic behavior of the signal of both short-term and long-term data recordings (2-4,13-15). The application of ApEn to cardiac signal analysis provides information about the autonomic modulation of HR, considering that increased signal regularity is related to pathological situations such as acute myocardial infarction (AMI). A study that evaluated HRV for an average period of 30 days post-AMI without the use of β -blockers found no correlation between the indexes of linear and nonlinear methods. Moreover, in this same study greater irregularity in HR dynamics was observed in AMI patients than in healthy subjects (2).

Santos-Hiss et al. (10), using linear models to evaluate the short-term evolution of the autonomic modulation of HR in patients taking β -blockers and receiving routine clinical intervention, observed no modification of HRV indexes between the 1st and 6th day after AMI.

Thus, the hypothesis of the present study was that both the application of a nonlinear method like ApEn and linear methods in the time and frequency domains could be used to identify and evaluate the HR dynamics of both post-AMI patients who take β -blockers and healthy individuals. Additionally, post-AMI patients presented alterations in the dynamics of autonomic modulation of HR compared to healthy subjects.

The objectives of the present study were: 1) to evaluate the relationship between HRV analysis in the time and frequency domains with ApEn in both post-AMI patients taking β -blockers and healthy individuals; 2) to compare HRV indexes on the 2nd and 7th day after AMI; 3) to compare the HRV indexes between AMI and healthy groups.

Material and Methods

Design and subjects

Sixty-four men (36 with AMI and 28 healthy subjects) ranging in age from 50 and 65 years volunteered for the study through personal invitation or advertising. In this group, 10 men with AMI (57 ± 9 years old) and 11 healthy men (54 ± 3 years old) were enrolled and completed the study. Figure 1 is a flow diagram presenting the sample loss in detail.

The AMI group was selected from two hospitals in the State of São Paulo, Brazil: the coronary units of Hospital dos Forneceadores de Cana in the city of Piracicaba and the Santa Casa de Misericórdia in the city of Limeira. Of the 36 volunteers who had been admitted to the coronary unit and diagnosed with AMI, 10 were included in the study. They had all been submitted to Doppler echocardiography and cardiac catheterization with chemical or mechanical reperfusion in the first hours after the diagnosis of AMI, had been using β -blocking therapy (atenolol, 46 ± 9.4 mg/day), their left ventricular ejection fraction was within normal limits (0.61 ± 0.06), and their clinical classification was Killip class I. For the healthy group, 28 volunteers were evaluated and 11 who presented no evidence of cardiovascular, respiratory, musculoskeletal, and/or metabolic anomalies were included. Participants in this group were taking no medications and did not smoke or drink.

Volunteers from both groups were attended by the hospital medical team, undergoing clinical and cardiovascular evaluation as well as biochemical blood tests [total cholesterol and fractions (HDL, LDL), glycemia, triglycerides, creatinine, and uric acid].

The diagnosis of AMI was confirmed by the presence of two or more of the following criteria: 1) precordialgia or retrosternal pain, either constrictive or burning, whether radiating or not to the upper limbs, neck and back, that lasted >30 min and was not treated with vasodilators; 2) elevation of segment ST >1 mm in at least two or more contiguous derivations in the electrocardiogram (ECG); 3) elevation of the myocardial necrosis markers creatine kinase-MB and creatine phosphokinase to twice the normal values (16).

This cross-sectional study was approved by the Ethics Committee of Universidade Metodista de Piracicaba (protocol #63/06). The relevance and experimental procedures of the study were described to the volunteers, who signed a free informed consent form.

Experimental procedures

HR and blood pressure (BP) data from the AMI group were collected in the coronary units on the 2nd and 7th day

after the coronary event, and data collection from the healthy group was performed at the institution's research laboratory. All protocols were carried out by the same researchers and in the morning to avoid circadian influence on the variables studied. The data collection environments were climate controlled, with temperature and relative humidity of approximately 23°C and 50%, respectively. Volunteers were instructed to avoid caffeine, alcohol and strenuous exercise on the day before the protocol. On the day of the experiment, the volunteers were interviewed to determine whether they had followed the instructions and if the control conditions (HR and BP) were within the normal range. While in the supine position, subject BP was checked three times using the Korotkoff auscultatory method with a mercury-column sphygmomanometer (WanMed, Brazil) and a stethoscope (Littman, USA).

In order to reduce anxiety, the volunteers were familiarized with the equipment and the protocol before the experiment.

Experimental protocol

First, the subjects were kept resting in the supine position for 10 min. Next, HR and RRi were recorded continuously for 15 min with a digital telemetry system consisting of a transmitter placed on the patient's chest and an HR monitor (Polar® S810i; Polar Electro, Oy, Finland). The system detects ventricular depolarization, corresponding to the R wave on the electrocardiogram, with a sampling rate of 500 Hz and a temporal resolution of 1 ms (17), and has been previously validated by Loimaala et al. (18), Gamelin et al. (19), and Vanderlei et al. (20). The RRi captured with the HR monitor can be analyzed with both linear and nonlinear models, including ApEn (21). After recording, the signals were transmitted to a receiver and interface connected to a computer for subsequent analysis.

Data analysis

Resting HR evaluation was based on the mean value of the 15-min assessment and BP evaluation was based on the mean value of BP measurements.

The first step in the data analysis involved a visual inspection of RRi (ms) distribution in the ECG in order to select the segments with the highest signal stability. Ectopic beats were excluded and 700 data points were used in the analysis.

HRV analysis was carried out using the following linear methods: A) in the time domain, RMSSD (square root of the mean of the sum of the squares of differences) between adjacent RRi divided by the number of RRi minus one, expressed in ms) and RMSM (square root of the sum of the squares of differences of individual values compared to the mean value, divided by the number of RRi in a period) (1); B) in the frequency domain, an autoregressive algorithm was used (22,23). Using power spectrum components, very low frequency (VLF = 0.003 at 0.04 Hz), low frequency (LF = 0.04 at 0.15 Hz) and high frequency bands (HF = 0.15 at 0.4 Hz) were obtained, as well as the ratio between absolute LF and HF areas (LF/HF ratio). Normalization was carried out by dividing the absolute power of a given component ms^2 (LF or HF) by the total power spectrum, subtracting the VLF component and multiplying by 100. HF and LF bands represent the action of vagal and sympathetic components in HR regulation, respectively (1).

The nonlinear method (ApEn) was carried out by the method of Pincus (13,14). The basic idea of ApEn is to determine the correlation measure for blocks of m samples of signal. Let x_i and x_j be any pair of blocks of size m samples of $u(1), u(2), \dots, u(N)$ signal, N the number of signal samples, a positive integer m ($m \leq N$) indicates the size of the blocks used for comparison, and a positive number integer r sets the upper limit on the consideration of similarity between x_i and x_j . Thus, it is possible to define the following correlation measure:

$$C_i^m(r) = \frac{B_i}{(N - m + 1)}$$

where B_i is the number of $x(j)$ blocks with a maximum distance of $x(i) \leq r$, i.e., number of $x(j)$ blocks such that $d[x(i), x(j)] \leq r$; $(N - m + 1)$ is the total amount of vector of size m in the signal.

The distance between two vectors can be calculated as:

$$d[x(i), x(j)] = \max_{k=1, \dots, m} (\mu(i+k-1) - \mu(j+k-1))$$

The following measure adds the contributions of the \log of the correlations:

$$\phi^m(r) = \frac{\sum_{i=1}^{N-m+1} \log C_i^m(r)}{N - m + 1}$$

where \log represents the natural logarithm. The function calculates the average natural logarithm of $C_i^m(r)$ functions. ApEn is then defined as:

$$ApEn(m,r) = \begin{cases} \lim_{N \rightarrow \infty} \{\Phi^m(r) - \Phi^{m+1}(r)\}, & m > 0 \\ \lim_{N \rightarrow \infty} \{-\Phi^1(r)\}, & m = 0 \end{cases}$$

Given N samples of the signal, the ApEn is implemented by defining the following statistic:

$$ApEn(m,r,N) = \begin{cases} \Phi^m(r) - \Phi^{m+1}(r) & m > 0 \\ -\Phi^1(r) & m = 0 \end{cases}$$

In our experiments the following values were used for the variables: $m = 2$ (size of the blocks used for comparison), $r = 20\%$ multiplied by the standard deviation of the signal (upper limit for considering data similarity), and $N = 700$ (number of data points in the signal).

Data were analyzed with MATLAB 6.5 (R13) using the HRV analysis routine.

Statistical analysis

According to the frequency distribution analysis (Kolmogorov-Smirnov), the data were not normally distributed. In order to evaluate the relationship between the HRV analyses in the time and frequency domains and ApEn, a simple linear regression was applied to the AMI group on the 2nd and 7th day and to the healthy group. The Wilcoxon nonparametric test was used to compare the HRV data from the AMI group on the 2nd and 7th day after the coronary event. The Mann-Whitney nonparametric test was used to compare the HRV data between the AMI group and the healthy group. The level of significance was established at 5% for all analyses. Calculations were performed using the BioEstat 5.0 software (Brazil). A pre-study power analysis suggested that a minimum of 10 subjects in each group and a 5% level of significance would yield at least an 80% power.

Results

Sample characteristics

Table 1 presents the data for the AMI group and the healthy group regarding age, anthropometric characteristics, resting cardiovascular variables, and clinical characteristics, as well as risk factors for the AMI group. No significant differences were observed between groups.

Analysis of HRV indexes

In the linear regression analysis between time and frequency domains and ApEn indexes, there was a significant correlation between the AMI group on the 2nd and 7th day after the coronary event and the healthy group (Table 2).

Figure 2A and B show that the RMSSD and RMSM HRV indexes of the healthy group were higher ($P < 0.05$) than those of the AMI group on the 2nd and 7th day. The indexes of the AMI group were similar on the 2nd and 7th day ($P > 0.05$). Frequency domain analysis revealed a higher Lfnu (normalized unit) index (Figure 2C) and LF/HF (Figure 2E) and a lower HFnu index (Figure 2D) in the AMI group on the 2nd and 7th day compared to the healthy group ($P < 0.05$), indicating that the healthy group presented lower sympathetic modulation and higher vagal modulation than the AMI group. No differences were found in the intergroup comparison for these indexes ($P > 0.05$). There were also no significant intergroup differences in the nonlinear HRV analysis based on ApEn (Figure 2E; $P > 0.05$), although the healthy group values were higher ($P < 0.05$) than those of the AMI group on the 2nd and 7th day.

Discussion

The results of the linear regression analysis between ApEn and linear methods in time and frequency domains in the present study demonstrate that the values of the coefficient of determination and the correlation coefficient were significant for both the AMI group on the 2nd and 7th day after coronary event and the healthy group. These results differ from the findings of Makikallio et al. (2) who, when comparing HRV in time and frequency domains with ApEn in

post-AMI patients, observed that the lower the time and frequency domain values, the higher the ApEn values. The differences between our results and those of Makikallio et al. (2) could be attributed to data processing methodology and/or to their decision to interrupt β -blocker and angiotensin-converting enzyme inhibitor use before the tests. Thus, they reported that AMI contributed to an increase in sympathetic tonus, which was reflected in increased signal complexity, and that the β -adrenergic system participated little in nonlinear HRV dynamics (24). Nevertheless, we consider that the lack of difference we found between nonlinear ApEn analysis and both time and frequency domain indexes could be attributed to β -adrenoceptor blockade.

Beckers et al. (24) assessed sympathetic and vagal activity in HR response and observed that after partial pharmacological blockade of the vagal component there was a decrease in the nonlinear complexity of HRV, suggesting that vagal activity is responsible for the introduction of complexity in HR variation.

Krstacic et al. (4) found lower ApEn indexes in post-AMI patients than in healthy individuals and attributed this to the signal's loss of complexity and irregularity due to reduced HRV, increased sympathetic modulation and decreased vagal modulation.

Regarding the comparison of HRV indexes evaluated on the 2nd and 7th day after AMI, we found no differences between time and frequency domains or ApEn in our study. This similarity should be considered because of the short evaluation period, i.e., a 5-day interval. Another fact to be considered is the use of drugs, specifically β -blockers, and the application of chemical or mechanical reperfusion on the first day after AMI.

According to Piegas et al. (16), β -blockers are first choice medicines for treating AMI since they reduce oxygen demand in the myocardium, HR, BP, and heart contraction. Lampert et al. (25) stated that these drugs, in addition to reducing the incidence of morbidity and mortality, act directly on the autonomic nervous system because they specifically antagonize the action of catecholamine on β -adrenergic receptors and consequently alter HRV indexes by reducing sympathetic activity and promoting parasympathetic recovery.

Considering the effects of β -blockers on the autonomic modulation of HR, we verified that, even though all patients from the AMI group were taking these drugs, the HRV indexes were similar on the 2nd and 7th day after the coronary event. Similarly, Carpeggiani et al. (26) observed no differences in HRV indexes when comparing the time of admission to and discharge from the hospital.

On the other hand, it has been reported that AMI patients who began the use of β -blockers between the 5th and 21st day after hospital admission and continued to use them for 6 weeks presented significant increases in time domain (RMSSD) and frequency domain (HF component) indexes, as well as a decrease in the LF/HF ratio (25). These results could be attributed to the period of β -blocker use, which has effects on the autonomic modulation of HR.

However, it is important to consider that successful chemical or mechanical reperfusion carried out immediately after AMI contributes to the preservation or increase of autonomic function, yielding HRV index values close to the normal range. Nevertheless, it has been observed that autonomic modulation of HR begins to recover from 30 to 60 days after angioplasty (27).

Regarding the coronary reperfusion of patients in the present study, which was carried out on the first day of admission and followed up with HRV analysis on the 2nd and 7th day, the time and frequency domains and ApEn indexes were similar. These results agree with Doulalas et al. (28) and Bonnemeier et al. (29), who reported that HRV indexes are not altered between the 1st and 5th day.

The reduction in the AMI group's HRV indexes compared to those of healthy individuals could be attributed to alterations in autonomic modulation in the sinoatrial node, reflected on lower vagal modulation and higher sympathetic modulation. Previous studies have reported that the alterations in autonomic modulation of HR after an ischemic cardiac event are due to modifications in ionic currents across the cell membrane, leading to electrical instability in the myocytes that promotes increased ventricular work and oxygen demand (25,27,30,31).

It is important to point out that the LFnu (0.79) and LF/HF (3.94) values we observed indicated an increase in the sympathetic autonomic modulation of post-AMI patients compared to healthy individuals. Carpeggiani et al. (26) evaluated the HRV response and observed greater LF/HF values in AMI patients who were still in the hospital than in healthy individuals. Similarly, Barbosa et al. (32) observed that patients with cardiac insufficiency also presented important alterations in the sympathetic and parasympathetic systems.

Regarding the ApEn results, our study agrees with Krstacic et al. (4), who observed ApEn values of 0.94 ± 0.13 in an AMI group. Moreover, our data are also similar to the results of Acharya et al. (33), who observed ApEn values of 1.68 for healthy, middle-aged individuals.

The intergroup ApEn differences could be attributed to the disease process. In AMI there is a loss of chaotic behavior (nonlinear) in favor of cyclic behavior or lack of variability, which represents a higher risk of abnormality and even mortality (15).

The present study was limited by the difficulty in selecting a sample that would satisfy the proposed inclusion criteria.

More detailed studies with larger samples are needed, as well as cross-sectional studies that include patients with AMI who have not received β -blocker therapy.

Clinical implications

HRV analysis using linear and nonlinear methods is considered to be important for evaluating and understanding cardiac autonomic modulation in pathological situations like AMI.

In summary, we observed that the HRV of the sample of AMI group patients who used β -blockers and were treated with coronary reperfusion was similar on the 2nd and 7th day. However, upon comparing post-AMI patients with healthy individuals, we observed that patients with AMI presented greater sympathetic modulation and a reduction in vagal modulation. HRV results from linear methods in the time and frequency domains agreed with those obtained by the nonlinear method ApEn. This suggests that linear methods in time and frequency domains and nonlinear methods like ApEn can be employed in the evaluation of the autonomic modulation of HR both in healthy subjects and in post-AMI patients.

Acknowledgments

The authors would like to thank CNPq for financial support (#579408/2008-6 to V.C. Kunz, and #308348/2009-5 and #478601/2010-7 to E. Silva) and the staff of the Hospital dos Fomecedores de Cana de Piracicaba and Hospital Santa Casa de Misericórdia de Limeira for allowing us to conduct this study. Special thanks are due to Dr. Luciano Domingues Dantas and the patients who participated in this study.

References

- Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation* 1996; 93: 1043-1065.
- Makikallio TH, Seppanen T, Niemela M, Airaksinen KE, Tulppo M, Huikuri HV. Abnormalities in beat to beat complexity of heart rate dynamics in patients with a previous myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 1005-1011.
- Oliveira DJ, Gomes MED, Guimarães HN, Aguirre LA. Síntese de sinais de variabilidade da frequência cardíaca baseada em modelagem não-linear. *Rev Soc Bras Eng Biomédica* 2006; 22: 51-62.
- Krstacic G, Krstacic A, Smalceij A, Milicic D, Jembrek-Gostovic M. The "Chaos Theory" and nonlinear dynamics in heart rate variability analysis: does it work in short-time series in patients with coronary heart disease? *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2007; 12: 130-136.
- Porta A, Guzzetti S, Montano N, Furlan R, Pagani M, Malliani A, et al. Entropy, entropy rate, and pattern classification as tools to typify complexity in short heart period variability series. *IEEE Trans Biomed Eng* 2001; 48: 1282-1291.
- Guzzetti S, Borroni E, Garbelli PE, Ceriani E, Della BP, Montano N, et al. Symbolic dynamics of heart rate variability: a probe to investigate cardiac autonomic modulation. *Circulation* 2005; 112: 465-470.
- Huikuri HV, Makikallio TH, Peng CK, Goldberger AL, Hintze U, Moller M. Fractal correlation properties of R-R interval dynamics and mortality in patients with depressed left ventricular function after an acute myocardial infarction. *Circulation* 2000; 101: 47-53.
- Stein PK, Domitrovich PP, Huikuri HV, Kleiger RE. Traditional and nonlinear heart rate variability are each independently associated with mortality after myocardial infarction. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005; 16: 13-20.
- Wallin BG, Charkoudian N. Sympathetic neural control of integrated cardiovascular function: insights from measurement of human sympathetic nerve activity. *Muscle Nerve* 2007; 36: 595-614.
- Santos-Hiss MD, Melo RC, Neves VR, Hiss FC, Verzola RM, Silva E, et al. Effects of progressive exercise during phase I cardiac rehabilitation on the heart rate variability of patients with acute myocardial infarction. *Disabil Rehabil* 2011; 33: 835-842.
- Pantoni CB, Di Thommazo L, Mendes RG, Catai AM, Luzzi S, Amaral NO, et al. Effects of different levels of positive airway pressure on breathing pattern and heart rate variability after coronary artery bypass grafting surgery. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44: 38-45.
- Perseguini NM, Takahashi AC, Rebelatto JR, Silva E, Borghi-Silva A, Porta A, et al. Spectral and symbolic analysis of the effect of gender and postural change on cardiac autonomic modulation in healthy elderly subjects. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44: 29-37.
- Pincus SM. Approximate entropy as a measure of system complexity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 2297-2301.
- Pincus S. Approximate entropy (ApEn) as a complexity measure. *Chaos* 1995; 5: 110-117.
- Pincus S. Approximate entropy in cardiology. *Herzschr Elektrophys* 2000; 11: 139-150.
- Piegas LS, Feitosa G, Mattos LA, Nicolau JC, Rossi Neto JM, Timerman A, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio com supradesnível do segmento ST. *Arq Bras Cardiol* 2009; 93: e179-e264.
- Ruha A, Sallinen S, Nissila S. A real-time microprocessor QRS detector system with a 1-ms timing accuracy for the measurement of ambulatory HRV. *IEEE Trans Biomed Eng* 1997; 44: 159-167.
- Loimaala A, Sievanen H, Laukkanen R, Parkka J, Vuori I, Huikuri H. Accuracy of a novel real-time microprocessor QRS detector

-
- for heart rate variability assessment. *Clin Physiol* 1999; 19: 84-88.
19. Gamelin FX, Berthoin S, Bosquet L. Validity of the polar S810 heart rate monitor to measure R-R intervals at rest. *Med Sci Sports Exerc* 2006; 38: 887-893.
 20. Vanderlei LC, Silva RA, Pastre CM, Azevedo FM, Godoy MF. Comparison of the Polar S810i monitor and the ECG for the analysis of heart rate variability in the time and frequency domains. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41: 854-859.
 21. Correa PR, Catai AM, Takakura IT, Machado MN, Godoy MF. [Heart rate variability and pulmonary infections after myocardial revascularization]. *Arq Bras Cardiol* 2010; 95: 448-456.
 22. Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 1991; 84: 482-492.
 23. Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S, Rimoldi O, Furlan R, Pizzinelli P, et al. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res* 1986; 59: 178-193.
 24. Beckers F, Verheyden B, Ramaekers D, Swynghedauw B, Aubert AE. Effects of autonomic blockade on non-linear cardiovascular variability indices in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 431-439.
 25. Lampert R, Ickovics JR, Viscoli CJ, Horwitz RI, Lee FA. Effects of propranolol on recovery of heart rate variability following acute myocardial infarction and relation to outcome in the Beta-Blocker Heart Attack Trial. *Am J Cardiol* 2003; 91: 137-142.
 26. Carpeggiani C, L'Abbate A, Landi P, Michelassi C, Raciti M, Macerata A, et al. Early assessment of heart rate variability is predictive of in-hospital death and major complications after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2004; 96: 361-368.
 27. Soares PP, Moreno AM, Cravo SL, Nobrega AC. Coronary artery bypass surgery and longitudinal evaluation of the autonomic cardiovascular function. *Crit Care* 2005; 9: R124-R131.
 28. Doulalas AD, Flather MD, Pipilis A, Campbell S, Studart F, Rizo IK, et al. Evolutionary pattern and prognostic importance of heart rate variability during the early phase of acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2001; 77: 169-179.
 29. Bonnemeier H, Hartmann F, Wiegand UK, Imer C, Kurz T, Tolg R, et al. Heart rate variability in patients with acute myocardial infarction undergoing primary coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 2000; 85: 815-820.
 30. Bigger JT Jr, Fleiss JL, Steinman RC, Rolnitzky LM, Kleiger RE, Rottman JN. Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation* 1992; 85: 164-171.
 31. La Rovere MT, Bigger JT Jr, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet* 1998; 351: 478-484.
 32. Barbosa PR, Barbosa FJ, de Sa CA. [Effects of age, sex and coronary heart disease on the autonomic modulation of the heart]. *Arq Bras Cardiol* 1996; 67: 325-329.
 33. Acharya UR, Kannathal N, Sing OW, Ping LY, Chua T. Heart rate analysis in normal subjects of various age groups. *Biomed Eng Online* 2004; 3: 24.

Table 1. Age, anthropometric characteristics, cardiovascular variables, and clinical characteristics of the groups studied.

	AMI group (N = 10)	Healthy group (N = 11)
Age and anthropometric characteristics		
Age (years)	57.10 ± 9.22	53.45 ± 3.42
Height (m)	1.67 ± 0.04	1.69 ± 0.05
Body mass (kg)	74.60 ± 13.09	79.59 ± 8.34
Body mass index (kg/m ²)	26.81 ± 4.22	27.86 ± 3.11
Cardiovascular variables		
Heart rate (bpm)	65.70 ± 10.86	70.18 ± 9.58
Systolic blood pressure (mmHg)	126.00 ± 13.49	116.42 ± 6.43
Diastolic blood pressure (mmHg)	76.00 ± 10.74	77.73 ± 4.10
Clinical characteristics		
Smoking	5 (50)	0 (0)
High blood pressure ≥140/90 mmHg	2 (20)	0 (0)
Fasting hyperglycemia ≥126 mg/dL	3 (30)	0 (0)
Hypercholesterolemia >240 mg/dL	3 (30)	0 (0)
Hypertriglyceridemia >200 mg/dL	4 (40)	0 (0)
AMI location		
Anterior	3 (30)	-
Posteroinferior	7 (70)	-
Killip clinical class I	10 (100)	-
LVEF >40%	10 (100)	-
Reperfusion		
Chemical	4 (40)	-
Mechanical	6 (60)	-
Medications		
β-blockers	10 (100)	-
ACEI	2 (20)	-

Data are reported as means ± SD, absolute values and percentage. AMI = acute myocardial infarction; LVEF = left ventricular ejection fraction; ACEI = angiotensin-converting enzyme inhibitors. The Mann-Whitney test was used to compare age and anthropometric characteristics and cardiovascular variables between groups; there were no statistically significant differences.

Table 2. Correlation between approximate entropy and indexes in time and frequency domains of HRV (RMSSD, RMSM, LFnu, HFnu, and LF/HF ratio) for the groups studied.

	AMI group, 2nd day (N = 10)			AMI group, 7th day (N = 10)			Healthy group (N = 11)		
	R ²	r	P	R ²	r	P	R ²	r	P
ApEn									
RMSSD (ms)	0.72	0.87	0.00	0.75	0.88	0.00	0.34	0.63	0.03
RMSM (ms)	0.35	0.65	0.03	0.43	0.70	0.02	0.45	0.71	0.01
LFnu	0.46	0.72	0.01	0.41	0.69	0.02	0.33	0.63	0.03
HFnu	0.46	0.72	0.01	0.41	0.69	0.02	0.33	0.63	0.03
LF/HF ratio	0.33	0.64	0.04	0.74	0.87	0.00	0.50	0.74	0.00

AMI = acute myocardial infarction; R² = determination coefficient; r = correlation coefficient; ApEn = approximate entropy; RMSSD = square root of the mean of the sum of the squares of differences between R-R intervals (RRi) divided by the number of RRi in a determined time minus one; RMSM = square root of the sum of the squares of differences of individual values compared to the mean value divided by the number of RRi in a period; ms = milliseconds; LF = low frequency; HF = high frequency; nu = normalized units (simple linear regression test).

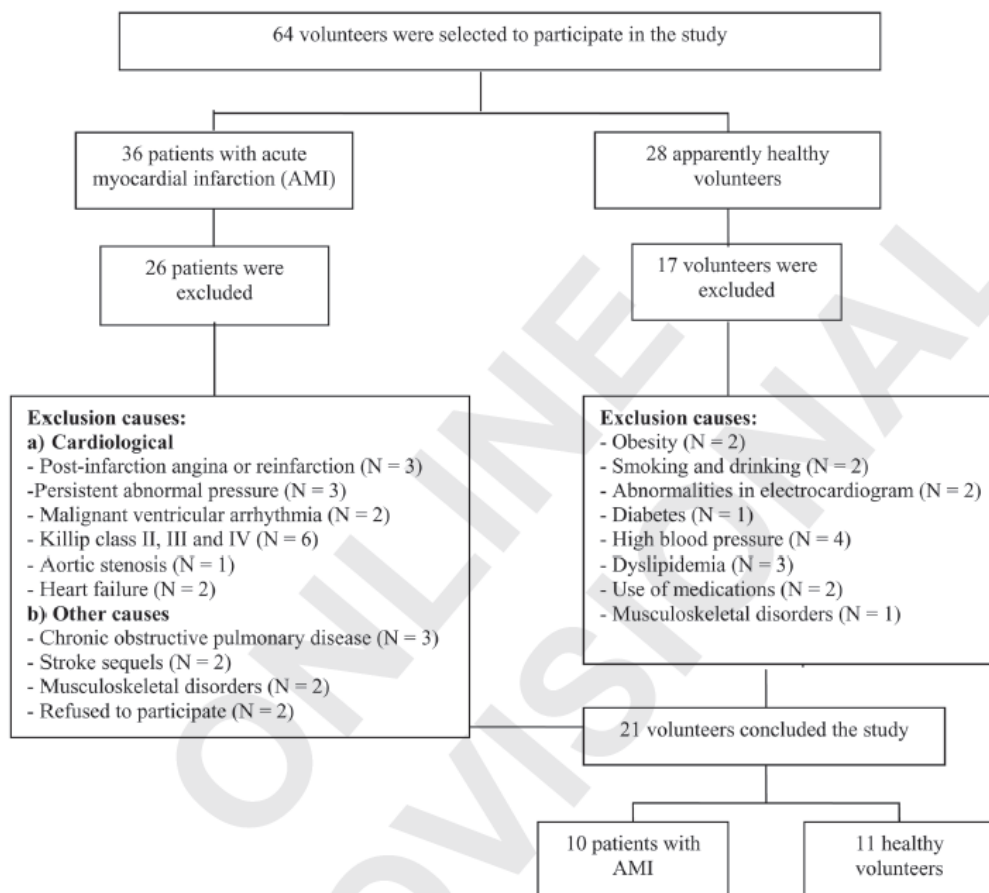


Figure 1. Flowchart of sample loss.

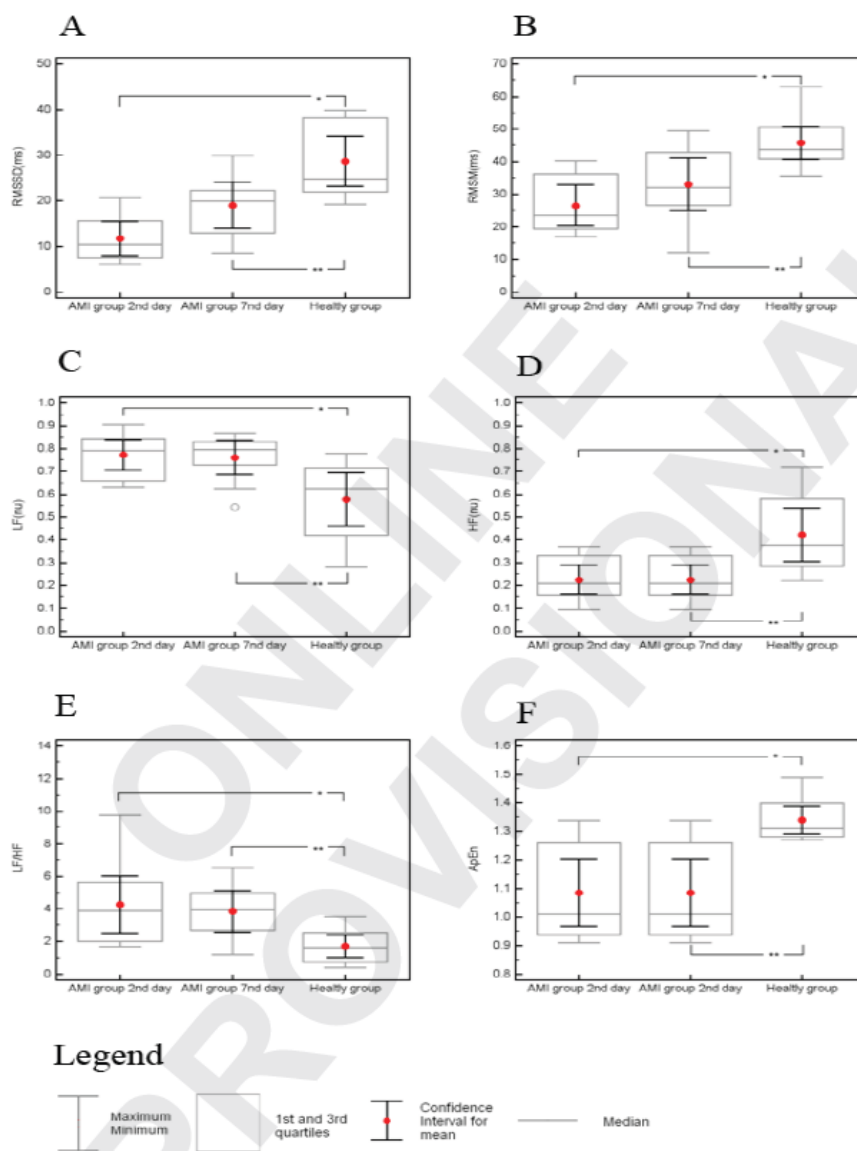


Figure 2. Box plot (median, confidence interval, 1st and 3rd quartiles, maximum and minimum) showing the results of the time domain analysis [RMSSD = square root of the sum of the squares of differences between RRI divided by the number of RRI in a determined time minus one (A); RMSM = square root of the sum of the squares of differences of individual values compared to the mean value divided by the number of RRI in a period (B)], the frequency domain analysis [LF = low frequency (C) and HF = high frequency (D) nu (normalized units), and LF/HF ratio (E)] and the nonlinear model analysis [ApEn = approximate entropy (F)], comparing the AMI group on the 2nd and 7th day to the healthy group. *P < 0.05, AMI group on the 2nd day compared to the healthy group (Mann-Whitney nonparametric test); **P < 0.05, AMI group on the 7th day compared to the healthy group (Mann-Whitney nonparametric test).

ANEXO E

Manuscrito “The relationship between cardiac autonomic function and clinical and angiographic characteristics in patients with coronary artery disease”, publicado no Brazilian Journal of Physical Therapy

The relationship between cardiac autonomic function and clinical and angiographic characteristics in patients with coronary artery disease

Relação entre a modulação autonômica cardíaca e as características clínicas e angiográficas de pacientes com doença arterial coronariana

Vandeni C. Kunz¹, Raquel B. Souza², Anielle C. M. Takahashi¹, Aparecida M. Catai¹, Ester Silva^{1,2}

Abstract

Background: A reduction in heart rate variability (HRV) is considered an important indicator of autonomic dysfunction. **Objectives:** The aims of this study were to evaluate the presence of autonomic dysfunction measured by HRV in patients with coronary artery disease (CAD) and to compare them with normal subjects. **Methods:** A sample of 52 men (mean age 54±5.39 years) was allocated into three groups: obstructive CAD ≥50% (CAD+ n=18), obstructive CAD <50%, (CAD- n=17) and apparently healthy controls (CG n=17). Heart rate (HR) was measured at rest using a Polar®S810i for 15 min. HRV was analyzed via Shannon entropy (SE) and symbolic analysis (0V and 2ULV), which relate to sympathetic and vagal predominance, respectively. Statistical analysis included the Kruskal-Wallis test and multivariate analysis (p<0.05). **Results:** The CAD+ group presented lower SE and 2ULV% values and higher 0V% compared to CAD- and control groups (p<0.05). In the multivariate analysis, the presence of the clinical characteristics such as myocardial infarction and revascularization in the CAD+ group lead to a lower SE and higher 0V compared to the CAD- group. The use of angiotensin converting enzymes led to a higher SE in the CAD- group compared to the CAD+ (p<0.05). **Conclusions:** In uncomplicated CAD+ patients the patterns of HRV have a lower complexity, a greater sympathetic modulation and a lower parasympathetic modulation compared to CAD- and control groups in supine resting conditions. These results indicate that autonomic heart dysfunction is related to the degree of coronary occlusion and cardiac compromise.

Keywords: Physical therapy; heart rate; coronary artery disease; nonlinear dynamics.

Resumo

Contextualização: A redução da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) é considerada como um importante marcador de disfunção autonômica. **Objetivos:** Avaliar a VFC em pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e compará-los com sujeitos saudáveis. **Métodos:** Cinquenta e dois homens (53±7,2 anos), divididos em três grupos, sendo dois grupos com obstrução coronariana (DAC+ com obstrução ≥50%, n=17 e DAC+ com obstrução <50%, n=18) e um grupo controle (GC, n=17). A frequência cardíaca (FC) foi captada batimento a batimento, a partir do Polar®S810i, em repouso supino, durante 15 minutos. A análise da VFC foi feita pelos cálculos da entropia de Shannon (ES) e pelos padrões da análise simbólica (0V e 2ULV%), relacionados à predominância simpática e vagal, respectivamente. A análise estatística incluiu o teste de Kruskal-Wallis e a análise multivariada (p<0,05). **Resultados:** O grupo DAC+ apresentou menores valores de ES e 2ULV% e maior 0V quando comparado aos grupos DAC- e GC. Na análise multivariada, observou-se menor ES e maior 0V na presença das características clínicas prévias, como infarto e revascularização do miocárdio no grupo DAC+ comparado ao grupo DAC-. O uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina contribuiu para maior ES do grupo DAC- comparado ao DAC+. **Conclusões:** Na DAC+ não complicada, os padrões da VFC apresentam menor complexidade, maior modulação autonômica simpática e menor modulação parassimpática comparativamente ao DAC- e ao GC em repouso supino. Esses resultados indicam que a disfunção autonômica cardíaca está relacionada ao grau de oclusão coronariana e ao comprometimento cardíaco.

Palavras-chave: Fisioterapia; frequência cardíaca; doença arterial coronariana; dinâmica não-linear.

Received: 08/12/2011 – Revised: 08/15/2011 – Accepted: 08/17/2011

¹ Laboratory of Cardiovascular Physical Therapy, Nucleus of Research in Physical Exercise, Physical Therapy Department, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brazil

² Faculty of Health Sciences, Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), Piracicaba, SP, Brazil

Correspondence to: Ester da Silva, Núcleo de Pesquisa em Exercício Físico, Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luis, Km 235, Caixa Postal 676, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brasil, e-mail: esilvas@unimep.br; vandenkunz@yahoo.com.br

Introduction

Physiological and environmental risk factors for developing coronary artery disease (CAD) such as smoking, obesity, sedentarism, arterial hypertension, diabetes and hypercholesterolemia, are well known. These risk factors alter autonomic function¹⁻³, which is associated with both the progression of CAD⁴ and increased mortality in the general population^{5,7}. This increased risk may be a result of electrical instability in the heart because of an unstable autonomic environment dominated by sympathetic nervous system influences^{8,9}.

Alterations in the cardiac autonomic nervous system of CAD patients are related to the degree of coronary artery occlusion. These alterations result in a decrease in the vagal modulation and an increase in the sympathetic modulation¹⁰. Heart rate variability (HRV) has been extensively used to evaluate autonomic nervous system balance. A reduction in HRV is associated with an increased risk of CAD¹¹⁻¹³.

Traditionally, HRV has been analyzed both in time and frequency domains using linear methods^{5,12}. However, it has been reported in the literature that heart rate (HR) dynamics are non-linear due to several oscillating subsystems that contribute through positive and negative feedback to the cardiovascular response. One of the most important subsystems is the autonomic nervous system, which modulates the HR¹⁴. Therefore, an analysis of non-linear HR dynamics using methods based on chaos theory has been proposed^{15,16}. Porta et al.¹⁷ reported the analysis of non-linear HR dynamics using Shannon entropy (SE) analysis method, which calculates the degree of complexity of a series of RR interval (RRI) patterns. Studying the complexity of autonomic cardiac regulation could provide important information about the underlying regulation mechanisms¹⁸. Thus, modification to complexity indices could predict a pathological situation and a global depression of the organism¹⁸.

Another non-linear method that has been used to analyze sympathetic and parasympathetic systems is the symbolic analysis of a sequence of three heart beats, which allows to estimate the prevalence of each branch of the cardiac autonomic nervous system¹⁹. Thus, identifying alterations in the autonomic nervous system of CAD patients using non-linear methods such as SE and symbolic analysis may be useful for early evaluation and stratification of risk, as well as for the evaluation and monitoring of clinical vulnerability of new cardiac events and physical exercise in these patients.

Our hypothesis was that the degree of coronary occlusion is related to impairment of cardiac autonomic modulation and a reduction of complexity of sympathovagal balance. Therefore, the aims of this study were to determine via HRV the presence of autonomic dysfunction based on SE and symbolic analysis in

patients with CAD and to determine if their HRV patterns are different from normal subjects.

Methods

Participants

A sample of 102 CAD male patients was interviewed and was considered eligible for the study via angiography at the Hospital Coronary Care Unit. The following inclusion criteria were set for participation in the study: from one to four compromised arteries (anterior descending artery, left and right coronary arteries, left circumflex artery, marginal and diagonal branches); myocardial infarction and angioplasty in the past six months; myocardial revascularization surgery in the past 12 months; obesity (body mass index between 30 and 35 kg/m²); smoking²⁰; drinking²¹; a low weekly level of physical activity according to the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) version 6²²; history of high blood pressure²³; history of dyslipidemia and diabetes mellitus.

Exclusion criteria included: frequent arrhythmias and extrasystoles (n=5); obstructive pulmonary disease (n=6); angioplasty carried out on the same day as the angiography (n=8); unstable angina (n=3); musculoskeletal disorders (n=5); insulin-dependent diabetes (n=6); systemic high blood pressure stages 2 and above (n=5); neoplasia (n=2); renal failure (n=3); stroke sequelae (n=4); use of beta blocker therapy (n=15) and refusal to participate in the study (n=5).

Based on the inclusion and exclusion criteria 35 men were included in this study (mean age 55±6.02 years). They were classified according to the results of the angiography as either CAD+ (n=18) or CAD- (n=17), i.e. with or without significant stenosis (≥50%) respectively, based on the Stable Angina Guidelines²⁴ and a left ventricular ejection fraction (LVEF) within normality according to ventriculography (CAD+=56.27±5.45 and CAD-=64.47±5.83). The control group (CG) consisted of 17 healthy male volunteers (mean age 53±3.68 years) whose medical status was certified by a full medical checkup including medical history, a physical examination, chest radiography, biochemical blood tests, electrocardiograms at rest and during exercise, and measurement of supine and standing blood pressure. The participants of the control group were also non-smokers, non-drinkers, were not taking any type of medication, and were not drug users.

This study was approved by the Ethics Research Committee of the Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP), Piracicaba, SP, Brazil (Number 04/09). All participants signed a consent form prior to the participation in the study.

Measurement and analysis of HRV

All experiments were carried out in the afternoon in order to avoid response differences due to circadian changes. Room temperature was kept at 22 °C with relative air humidity between 40% and 60%. The day before the experiment, the participants were taken to the experimental room for familiarization with the producers and the equipment to be used. Each subject was instructed to abstain from stimulants (coffee, tea, soft drinks), alcoholic beverages and excessive physical activity in the 24 hours prior to the exam, as well as to have a light meal at least 2 hours before the measurements.

To assess autonomic modulation, each subject's HR and RRi were measured for 15 minutes, captured digitally, and transferred to a computer for later analysis. All data were obtained before angioplasty using a Polar Advanced S810i® HR monitor and a transmitter belt (*Polar Electro Co.Ltda. Kempele, Finland*). All subjects were carefully instructed and the measurements were taken in the presence of the chief investigator of the study. The participants were resting, awake and in supine position with their hands lying at their sides. After resting for 15 minutes, blood pressure and HR were measured to determine whether the basal conditions of the subjects were adequate for the experiment. The HR monitor registered RRi via a transmitter attached to the thorax and a wristband.

HR monitors provide information recording RRi, which is defined as the time interval between two adjacent QRS complexes (the extension of the heart cycle). The Polar Advanced S810i detects the RR waves from the electrocardiogram with a 500 Hz sampling frequency and one-millisecond time resolution²⁵. After transferring the data to the computer, the RRi series were analyzed and any interference was eliminated. For this measurement, the region of the greatest stability for gathering RRi was used so that 300 consecutive beats from the same time segment were presented for all participants¹². To analyze HRV, SE and symbolic analysis were used, both of which have been fully described and validated previously¹⁷.

Symbolic analysis

This approach, which has been described by Porta et al.¹⁷, is based on 1) transforming a heart period variability series into a sequence of integers (i.e., symbols), 2) constructing patterns (i.e., words), 3) reducing the number of patterns by grouping them into a small number of families, and 4) evaluating the rates of occurrence of these families. A coarse-graining approach based on a uniform quantization procedure was used to transform the RR series into a sequence of symbols. Briefly, the full range of the series was spread over ξ symbols with a

resolution of $(RR_{max}-RR_{min})/\xi$, where RRmax and RRmin were the maximum and the minimum of the series. After quantization, the RR series became a sequence $RR_{\xi} = \{RR_{\xi}(i), i=1, \dots, N\}$ of integer values ranging from 0 to $\xi-1$ ¹⁷. The technique of delayed coordinates was used to transform the RR_{ξ} series into a sequence of patterns $RR_{\xi^L} = \{RR_{\xi^L}(i), i=L, \dots, N\}$ with $RR_{\xi^L}(i) = [RR_{\xi}(i), RR_{\xi}(i-1), \dots, RR_{\xi}(i-L+1)]$. The number of possible $RR_{\xi^L}(i)$ was ξ^L . Since ξ^L grew very rapidly with L and ξ , both parameters had to be small. For applications over short data sequences, the best compromise was $\xi=6$ and $L=3$, and the number of possible patterns was 216¹⁷.

To reduce the number of patterns without losing information, we followed a procedure of redundancy reduction. All the patterns were grouped without loss into four families, according to the number and types of variations from one symbol to the next. The pattern families were as follows: 1) patterns with no variation [0V: all the symbols are equal, e.g., (4,4,4) or (2,2,2)], 2) patterns with one variation [1V: 2 consecutive symbols are equal and the remaining symbol is different, e.g., (3,4,4) or (4,4,2)], 3) patterns with two like variations [2LV: the 3 symbols form an ascending or descending ramp, e.g., (1,2,4) or (4,3,2)], and 4) patterns with two unlike variations [2ULV: the 3 symbols form a peak or a valley, e.g., (2,4,2) or (4,1,2)]¹⁷. We evaluated the rates of occurrence of these families, which were designated 0V%, 1V%, 2LV%, and 2ULV%. To compute these indices, we simply count the number of times a pattern $R_{\xi^L} = \{i, j, k\}$ belonging to a specific family was found in $RR_{\xi^L} = \{i, j, k\}$. The result (multiplied by 100) was divided by $[N-(L-1)]$ ¹⁷.

Studies with pharmacological blockade¹⁹ and autonomic tests have indicated that 0V% and 2ULV% indices are able to assess sympathetic and parasympathetic modulations, respectively.

Shannon Entropy (SE) analysis

The SE of the pattern distribution was calculated to provide a description of pattern distribution complexity, i.e., SE is an index describing the shape of the distribution of the patterns. The SE is large if the distribution is flat (all patterns are identically distributed and the series carries the maximum amount of information). On the other hand, the SE is small if there is a probable subset of patterns, while others are missing or infrequent (e.g., in a Gaussian distribution)^{17,26}.

Data analysis

The series length N was fixed at 300 beats. The mean RR and the variance of the RR series were calculated.

Statistical analysis

For the between-group analysis of the SE data and the 0V and 2ULV patterns, the Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc was used. The HRV (SE, 0V and 2ULV) relationship with covariant clinical characteristics (myocardial infarction >6 months, myocardial revascularization >12 months, angioplasty >6 months, number of diseased vessels and location of stenosis), risk factors (hypertension, diabetes mellitus, dyslipidemia, family predisposition to CAD, obesity, smoking and drinking) and medications (angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors, hypolipidemic, hypoglycemic, diuretics and antiplatelet) was analyzed with the multivariate test model type III and Bonferroni post hoc. The significance level was set at 5% for all analysis ($p < 0.05$). The programs SPSS 13.0 for Windows and Statistica for Windows v 6.1 (Stat Soft, Inc. 2000-2003) were used. A study-power analysis suggested that a minimum of 14 subjects analyzed in each group and a 5% significance level (two-tailed) would yield at least 80% power for detecting differences between the variables SE, 0V and 2ULV.

Results

Clinical characteristics

Table 1 shows the baseline characteristics and cardiovascular parameters of participants which can be observed that the three groups were similar, including systolic and diastolic blood pressure (SBP and DBP) (mmHg), HR (bpm), RRi (ms) and estimated LVEF (%) results at rest in the supine position. There was a statistically significant difference between the CAD+ and CG for HR ($p < 0.05$). However, there were no significant differences for the other variables ($p > 0.05$).

Table 1. Clinical characteristics of the participants at baseline.

Variables	CAD+ n=18	CAD- n=17	Control n=17
Age (years)	57±4.86	52±6.11	53±3.68
Weight (kg)	79.81±14.59	78.44±15.68	76.12±6.43
Height (m)	1.67±0.07	1.70±0.04	1.73±0.04
BMI (kg/m ²)	28.29±4.52	26.68±4.04	25.19±1.65
SBP (mmHg)	133.33±14.95	121.17±10.53	120±11.18
DBP (mmHg)	84.16±8.08	81.17±7.81	78.23±6.35
HR (beats/min)	72.11±7.51*	65.70±8.09	63.11±4.83
RR intervals (ms)	890.65±138.91	903.50±136.37	948.32±91.70
Estimated LVEF (%)	56.27±5.45	64.47±5.83	—

Mean±SD for continuous variables. CAD+=patients with significant coronary artery stenosis (>50%); CAD-=patients without significant coronary artery stenosis (<50%); SBP= systolic blood pressure; DBP=diastolic blood pressure; HR=heart rate; LVEF=left ventricular ejection fraction. * $p < 0.05$ (CAD+ group vs control group).

Data regarding the participants' clinical characteristics, risk factors and medication used by group are presented in Table 2.

Heart rate variability indices

Figure 1A shows HRV analysis via SE and symbolic analysis; the between-group analysis presented statistically significant differences. SE in the CAD+ group was significantly lower than in CAD- and CG (3.28, 3.51 and 3.53, respectively, $p < 0.05$). The 0V pattern was lower in CG and CAD- than the CAD+ group (24.74, 26.08 and 31.26, respectively, $p < 0.01$) (Figure 1B), and the 2ULV pattern was lower in the CAD+ group than both the CAD- and CG (12.54, 16.72 and 19.69, respectively, $p < 0.05$) (Figure 1C).

Multivariate analysis

Regarding the relationship between group means, according to the data from the HRV analysis and the presence

Table 2. Clinical and angiographic data, risk factors and medications.

Clinical Characteristics	CAD+ yes/no	CAD- yes/no	Control yes/no
Myocardial infarction (>6 months)	4/14	0/17	0/17
Myocardial revascularization (>12 months)	6/12	0/17	0/17
Angioplasty (>6 months)	4/14	0/17	0/17
No. of diseased vessels			
One diseased vessel	6/12	11/6	0/17
Two diseased vessels	5/13	6/11	0/17
Three or four diseased vessels	8/10	0/17	0/17
Location of stenosis			
Anterior descending artery	14/4	11/6	0/17
Right coronary artery	11/7	6/11	0/17
Left circumflex artery	5/13	2/15	0/17
Marginal arteries	7/11	3/14	0/17
Diagonal arteries	7/11	0/17	0/17
Risk factors			
Hypertension	15/3	6/11	0/17
Diabetes mellitus	9/9	2/15	0/17
Dyslipidemia	11/7	8/9	0/17
Family predisposition to CAD	9/9	4/13	0/17
Overweight (BMI between 25 and 30 kg/m ²)	7/11	5/12	5/12
Obesity (BMI > 30 kg/m ²)	7/11	4/13	0/17
Smoking	6/12	3/14	0/17
Drinking	2/16	3/14	0/17
Medications			
ACE-inhibitors	7/11	6/11	0/17
Hypolipidemic	10/8	4/13	0/17
Hypoglycemic	6/12	2/15	0/17
Diuretics	6/12	2/15	0/17
Antiplatelet	16/2	5/12	0/17

CAD+=patients with significant coronary artery stenosis; CAD-=patients without significant coronary artery stenosis; ACE=angiotensin-converting enzyme.

of clinical characteristics, risk factors and medications used (shown in Table 3); it was observed that among patients of the CAD+ group who had a history of infarction and myocardial revascularization, the SE values were lower and the OV pattern was higher compared to the CAD- group ($p < 0.05$). Regarding the use of ACE inhibitors, the patients from the CAD- group who used this medication presented higher SE compared to the CAD+ group ($p < 0.05$). However, the 2ULV pattern presented no relationship with clinical characteristics, risk factors or medications.

Table 3. Multivariate analysis of mean between groups, according heart rate variability variables and the presence of clinical characteristics, risk factors and medications.

Clinical Characteristics	Variables		
	SE	OV	2ULV
Myocardial infarction (>6 months)	ns	CAD+ > CAD- and control*	ns
Myocardial revascularization (>12 months)	ns	CAD+ > CAD- and control*	ns
Angioplasty (>6 months)	ns	ns	ns
No. of diseased vessels			
One vessel disease	ns	ns	ns
Two vessel disease	ns	ns	ns
Three or four vessel disease	ns	ns	ns
Location of stenosis			
Anterior descending artery	ns	ns	ns
Right coronary artery	ns	ns	ns
Left circumflex artery	ns	ns	ns
Marginal arteries	ns	ns	ns
Diagonal arteries	ns	ns	ns
Risk factors			
Hypertension	ns	ns	ns
Diabetes mellitus	ns	ns	ns
Dyslipidemia	ns	ns	ns
Familial predisposition to CAD	ns	ns	ns
Overweight (BMI between 25 and 30 kg/m ²)	ns	ns	ns
Obesity (BMI > 30 kg/m ²)	ns	ns	ns
Smoking	ns	ns	ns
Drinking	ns	ns	ns
Medications			
ACE-inhibitors	CAD+ < CAD-*	ns	ns
Hypolipidemic	ns	ns	ns
Hypoglycemic	ns	ns	ns
Diuretics	ns	ns	ns
Antiplatelet	ns	ns	ns

SE=Shannon entropy; OV= patterns with no variation; 2ULV=patterns with two unlike variations; CAD+=patients with significant coronary artery stenosis; CAD-=patients without significant coronary; Control=control group; ACE=angiotensin-converting enzyme; ns=not statistically significant. * $p < 0.05$.

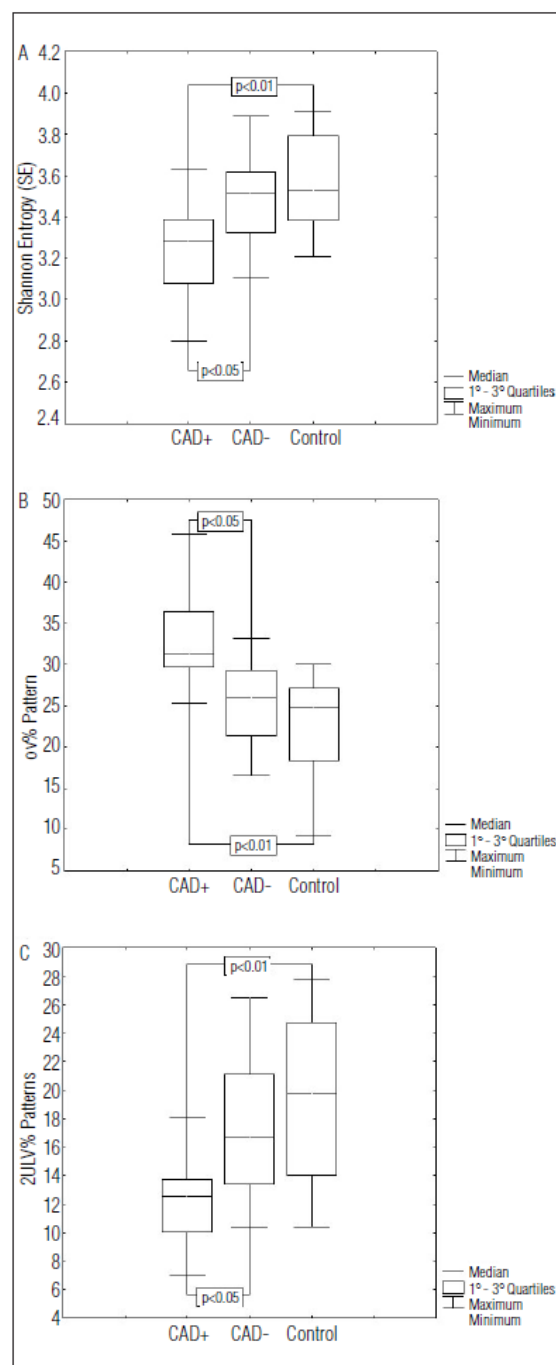


Figure 1. Box Plot (Median, 1° and 3° quartiles, minimum and maximum) showing results of Shannon entropy (1A) and symbolic analysis (OV, patterns with no variation (1B) and 2ULV, patterns with two unlike variations (1C)) in the CAD+ (patients with significant coronary artery stenosis), CAD- (patients without significant coronary) and control groups.

Discussion ♦♦♦♦

The results of this study, based on SE and symbolic analysis, indicate presence of autonomic heart dysfunction in CAD patients with $\geq 50\%$ occlusion compared to either CAD patients with $< 50\%$ obstruction and normal subjects.

SE is a measure of the complexity of the distribution of the sample of a signal¹⁷. Our results suggest that the complexity of autonomic HR modulation is related to the severity of coronary occlusion, given that the CAD+ group presented a reduction in SE compared to CAD- and control groups. A reduction in SE is related to cardiac sympatho-vagal imbalance, which can predict global depression as well as other pathological situations¹⁸. Voss et al.²⁷ observed a decrease in SE patterns in patients after myocardial infarction, which is related to an increase in the risk of malignant arrhythmias and sudden cardiac death.

In our study, CAD+ patients presented lower SE as well as alterations in symbolic analysis patterns, with a decrease in the 2ULV pattern and an increase in the 0V pattern compared to the CAD- and control groups. The 0V patterns are features of slow waves (LF oscillations), while 2LV and 2ULV patterns are fragments of faster waves (HF oscillations)¹⁷. Symbolic patterns have been linked to sympathetic and vagal cardiac modulation in previous studies with pharmacological blockade and autonomic tests in healthy and diseased populations^{19,26,28,29}. The 0V pattern has been associated with sympathetic modulation while 2ULV has been associated with vagal modulation^{19,29}. Therefore, our results suggest that patients from the CAD+ group have increased sympathetic modulation and decreased vagal modulation, which are related to the severity of the coronary occlusion.

These findings agree with previous studies involving linear methods, which observed that coronary insufficiency led to dysfunction of the autonomic modulation of HR characterized by an increase in sympathetic modulation or a decrease in vagal modulation³⁰⁻³².

The imbalance in autonomic modulation that accompanies CAD is due to increased sympathetic adrenergic tone and reduced parasympathetic activity, which causes augmented ventricular workload and oxygen demand, thus increasing the occurrence of ischemic events, and causes modification to the ionic currents across the cellular membrane, leading to direct electrical instability of myocytes³⁰. It is known that abnormal autonomic function predisposes arrhythmias under various clinical and experimental conditions, particularly during physical stress. Therefore, important prognostic information about the appearance of undesirable events, including cardiac mortality, can be obtained from an analysis of HRV indices^{10,27}.

Regarding the relationship between variables obtained from the HRV analysis and clinical characteristics, risk factors and

the use of medication, the results demonstrated that patients from the CAD+ group who had a previous history of myocardial infarction and revascularization presented lower SE and higher 0V pattern than the CAD- group. This means that, even six months after AMI and the revascularization period, these two clinical characteristics associated with the degree of coronary occlusion were the ones that most contributed to the decrease of complexity in autonomic modulation and to the increase in sympathetic modulation. This corroborates the finding of longitudinal studies that have evaluated patients after AMI³³⁻³⁵ or myocardial revascularization surgery^{36,37} that autonomic dysfunction could be present up to 12 months after a coronary event.

Upon analyzing the relationship between HRV variables and medication use, it was observed that there was a higher SE value for patients from the CAD- group compared to the CAD+ group when subjects who used ACE inhibitors were considered. This reflects a greater complexity of RRI series for patients from the CAD- group. Due to the inhibition of angiotensin II functions along with the consequent attenuation of vasoconstriction and sympathetic activity³⁸ ACE inhibitors lead to significant recovery of HRV indices, as observed through linear methods, which implies an improvement in the autonomic modulation of HR and a satisfactory prognosis³⁹.

Thus, in general terms, the results of the present study show those patients from the CAD+ group, even after myocardial revascularization and the use of ACE inhibitors, present higher sympathetic autonomic modulation, suggesting that they may be more vulnerable to develop new cardiovascular events.

Limitations

This study was limited by the difficulty in selecting a sample that fulfilled the proposed inclusion criteria, as well as by the heterogeneity of the patient sample. Due to such factors, myocardial infarction and revascularization influenced the results.

Clinical and practical implications

The results of this study demonstrate that in CAD patients there is a reduction in the complexity of cardiovascular regulation due to a reduction in autonomic vagal modulation and an increase in sympathetic autonomic modulation. Thus, evaluating the autonomic modulation of HR by SE and symbolic analysis contributes to the identification of alterations in HR autonomic modulation and could provide useful clinical information without the need for additional sophisticated analysis. Furthermore, HRV analysis becomes relevant for both early screening and risk stratification for heart disease as well as for the clinical follow-up of patients who are known to have CAD.

Furthermore, the objective of introducing HRV analysis by means of SE and symbolic analysis is to encourage the use of this non-invasive technique in the area of cardiac rehabilitation, making it possible to evaluate and reevaluate HR autonomic modulation before and after physical therapy interventions.

Conclusions

In uncomplicated CAD+, the patterns of HRV presented lower complexity of HR autonomic modulation, higher sympathetic modulation and lower parasympathetic modulation in

basal conditions. These results indicate that autonomic heart dysfunction is associated with the severity of coronary occlusion. However, this issue requires further studies with larger patient populations.

Acknowledgements

To Dr. Alberto Porta for providing program analysis of SE and symbolic analysis. This work was supported by the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (579408/2008-6 and 308348/2009-5) and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (0021058210).

References

- Mussalo H, Vanninen E, Ikkäheimo R, Laitinen T, Laakso M, Lämsimies E, et al. Heart rate variability and its determinants in patients with severe or mild essential hypertension. *Clin Physiol*. 2001;21(5):594-604.
- Pehliavandis AN, Athyros VG, Demetriadis DS, Papageorgiou AA, Bouloukos VJ, Kontopoulos AG. Heart rate variability after long-term treatment with atorvastatin in hypercholesterolaemic patients with or without coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2001;157(2):463-9.
- Vaccarino V, Lampert R, Bremner JD, Lee F, Su S, Maisano C, et al. Depressive symptoms and heart rate variability: evidence for a shared genetic substrate in a study of twins. *Psychosom Med*. 2008;70(6):628-36.
- Huikuri HV, Jokinen V, Syväne M, Nieminen MS, Airaksinen KE, Ikkäheimo MJ, et al. Heart rate variability and progression of coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(8):1979-85.
- Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Berger AC, Cohen RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science*. 1981;213(4504):220-2.
- Liao D, Cai J, Rosamond WD, Barnes RW, Hutchinson RG, Whitset EA, et al. Cardiac autonomic function and incident coronary heart disease: a population-based case-cohort study. *Am J Epidemiol*. 1997;145(8):696-706.
- Tsuji H, Larson MG, Venditti FJ Jr, Manders ES, Evans JC, Feldman CL, et al. Impact of reduced heart rate variability on risk for cardiac events. The Framingham Heart Study. *Circulation*. 1996;94(11):2850-5.
- Kleiger RE, Miller P, Bigger JT Jr, Moss AJ. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1987;59(4):256-62.
- Huikuri HV, Mäkilä TH. Heart rate variability in ischemic heart disease. *Auton Neurosci*. 2001;90(1-2):95-101.
- Wennerblom B, Lurje L, Tygesen H, Vahisalo R, Hjalmarson A. Patients with uncomplicated coronary artery disease have reduced heart rate variability mainly affecting vagal tone. *Heart*. 2000;83(3):290-4.
- Bigger JT Jr, Fleiss JL, Steinman RC, Rolnitzky LM, Kleiger RE, Rottman JN. Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction. *Circulation*. 1992;85:164-71.
- Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation*. 1996;93(5):1043-65.
- Novais LD, Sakabe DI, Takahashi ACM, Gongora H, Taciro C, Martins LEB, et al. Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca em repouso de homens saudáveis, sedentários e hipertensos e de coronariopatas em treinamento físico. *Rev Bras Fisioter*. 2004;8(3):207-13.
- Signorini MG, Marchetti F, Cerutti S. Applying nonlinear noise reduction in the analysis of heart rate variability. *IEEE Eng Med Biol Mag*. 2001;20(2):59-68.
- Goldberger AL, Amaral LA, Glass L, Hausdorff JM, Ivanov PC, Mark RG, et al. PhysioBank, Physio Toolkit, and PhysioNet: components of a new research resource for complex physiological signals. *Circulation*. 2000;101(23):E215-20.
- Freitas U, Roulin E, Muir JF, Lelellier C. Identifying chaos from heart rate: the right task? *Chaos*. 2009;19(2):028505.
- Porta A, Di Rienzo MD, Wessel N, Kurths J. Addressing the complexity of cardiovascular regulation. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*. 2009;367(1892):1215-8.
- Porta A, Guzzetti S, Montano N, Furlan R, Pagani M, Malliani A, et al. Entropy, entropy rate, and pattern classification as tools to typify complexity in short heart period variability series. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2001;48(11):1282-91.
- Guzzetti S, Borroni E, Garbelli PE, Ceriani E, Bella PD, Montano N, et al. Symbolic dynamics of heart rate variability: a probe to investigate cardiac autonomic modulation. *Circulation*. 2005;112(4):465-70.
- Iglesias R, Jha P, Pinto M, Silva VLC, Godinho J. Controle do tabagismo no Brasil. Washington, DC: Banco Mundial; 2007.
- Gaziano JM, Hennekens C. Royal colleges' advice on alcohol consumption: maintaining existing limits seems justified on current evidence. *BMJ*. 1995;311(6996):3-4.
- Hallal PC, Victora CG. Reliability and validity of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ). *Med Sci Sports Exerc*. 2004;36(3):556.
- Mion Jr D, Kohlmann Jr O, Machado CA, Amodeo C, Gomes MAM, Praxedes JN, et al. V Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. *Arq Bras Cardiol*. 2007;89(3):e24-79.
- Diretrizes de doença coronariana crônica angina estável. *Arq Bras Cardiol*. 2004;83 Supl II:1-43.
- Garnel FX, Berthoin S, Bosquet L. Validity of the polar S810 heart rate monitor to measure R-R intervals at rest. *Med Sci Sports Exerc*. 2006;38(5):887-93.
- Takahashi ACM, Porta A, Melo RC, Quitério RJ, da Silva E, Borghi-Silva A, et al. Aging reduces complexity of heart rate variability assessed by conditional entropy and symbolic analysis. *Intern Emerg Med*. 2011; DOI: 10.1007/s11739-011-0512-z.
- Voss A, Kurths J, Kleiner HJ, Witt A, Wessel N, Sagarin P, et al. The application of methods of non-linear dynamics for the improved and predictive recognition of patients threatened by sudden cardiac death. *Cardiovasc Res*. 1996;31(3):419-33.
- Maestri R, Pinna GD, Accardo A, Allegrini P, Balocchi R, D'Addio G, et al. Nonlinear indices of heart rate variability in chronic heart failure patients: redundancy and comparative clinical value. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2007;18(4):425-33.
- Porta A, Tobaldini E, Guzzetti S, Furlan R, Montano N, Gnecchi-Ruscone T. Assessment of cardiac autonomic modulation during graded head-up tilt by symbolic analysis of heart rate variability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(1):H702-8.
- La Rovere MT, Bigger JT Jr, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet* 1998;351(9101):478-84.
- Kuo CD, Chen GY. Comparison of three recumbent positions on vagal and sympathetic modulation using spectral heart rate variability in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1998;81(4):392-6.

32. Abildstrom SZ, Jensen BT, Agner E, Torp-Pedersen C, Nyvad O, Wachtell K, et al. Heart rate versus heart rate variability in risk prediction after myocardial infarction. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003;14(2):168-73.
33. Binkley PF, Orsinelli DA, Nunziata E, Patterson SP, Khot UN, Puri R, et al. Differing autonomic response to dobutamine in the presence and absence of ischemia: implications for the autonomic contribution to positive inotropic intervention. *Am Heart J*. 1995;130(5):1054-61.
34. Kleiger RE, Stein PK, Bosner MS, Rottman JN. Time domain measurements of heart rate variability. *Cardiol Clin*. 1992;10(3):487-98.
35. Perkiömäki JS, Hämeikoski S, Junttila MJ, Jokinen V, Tapanainen J, Huikuri HV. Predictors of long-term risk for heart failure hospitalization after acute myocardial infarction. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2010;15(3):250-8.
36. Santangeli P, Sgueglia GA, Sestilo A, Lamendola P, Mariani L, Infusino F, et al. Different effect of percutaneous and surgical coronary revascularization on cardiac autonomic function and inflammation in patients with stable angina. *Int J Cardiol*. 2008;127(2):269-70.
37. Laitio TT, Huikuri HV, Koskenvuo J, Jalonen J, Mäkkilä TH, Helenius H, et al. Long-term alterations of heart rate dynamics after coronary artery bypass graft surgery. *Anesth Analg*. 2006;102(4):1026-31.
38. Dibner-Dunlap ME, Smith ML, Kinugawa T, Thames MD. Enalaprilat augments arterial and cardiopulmonary baroreflex control of sympathetic nerve activity in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27(2):358-64.
39. Lewandowski J, Abramczyk P, Dobosiewicz A, Bidiuk J, Sinski M, Gaciong Z. The effect of enalapril and telmisartan on clinical and biochemical indices of sympathetic activity in hypertensive patients. *Clin Exp Hypertens*. 2008;30(5):423-32.

ANEXO F

Comprovante de submissão do manuscrito "*I/D polymorphism of the ACE gene does not influence autonomic modulation of heart rate in patients with coronary disease*" no International Journal of Cardiology

Submission Confirmation

DE: International Journal of Cardiology

PARA: vandenikunz@yahoo.com.br

Mensagem sinalizada

Terça-feira, 24 de Janeiro de 2012 17:01

Dear Dr Kunz,

Your submission entitled "I/D polymorphism of the ACE gene does not influence autonomic modulation of heart rate in patients with coronary disease" has been received by International Journal of Cardiology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/ijc/>.

Your username is: vandenikunz

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/ijc/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

For guidelines on how to submit your revised manuscript please go the following address: <http://epsupport.elsevier.com/article.aspx?article=1405&p=3>

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
International Journal of Cardiology

Anexo G

Manuscrito "*I/D polymorphism of the ACE gene does not influence autonomic modulation of heart rate in patients with coronary disease*" submetido ao International Journal of Cardiology

I/D polymorphism of the ACE gene does not influence autonomic modulation of heart rate in patients with coronary disease

Vandeni C. Kunz M.S.^a, Ana Cristina S. Rebelo Ph.D^a, Rozangela Verlengia Ph.D^b, Tarcisio A. G. Nery M.S.^b, Mariana R. Salviati M.S.^b, Roberta F. Paula M.S.^b, Marina D. Crepaldi M.S.^b, Pedro Ferreira Filho Ph.D.^c, Ester da Silva Ph.D.^{a,b}

^aPhysiotherapy Department - Federal University of São Carlos - São Carlos, SP, Brazil.

^b Faculty of Health Sciences, Methodist University of Piracicaba, Piracicaba, SP, Brazil.

^cStatistics Department - University of São Carlos - São Carlos, SP, Brazil.

Corresponding author:

Ester Da Silva

Federal University of São Carlos, São Carlos - SP, Brazil. Rodovia Washington Luís, km 235, CEP 13565-905, São Carlos-SP, Brazil Fax: +55-16-3361-2081

e-mail: vandenikunz@yahoo.com.br and/or esilvas@unimep.br

Financial Support: CNPq (#579408/2008-6 to V.C.K.; #308348/2009-5 to E.S.; #478601/2010-7 to E.S.).

Short title: I/D polymorphism of the ACE gene and autonomic modulation of HR.

Abstract

Contextualization: The influence of genetic and environmental factors on the autonomic modulation of heart rate (HR) is still little understood. The objective of this study, therefore, was to evaluate the influence of I/D polymorphism of the ACE gene on the autonomic modulation of HR in patients with coronary artery disease (CAD) and its association with risk factors. **Methods:** 151 patients (56 ± 8 years) with CAD participated in the study, divided according to genotype for the ACE gene I/D variant (rs1799752) (DD, n=54; ID, n=70 and II, n=27). The measurements of the principal outcomes were the presence of risk factors, BP data, HR and HRV indexes, whose analysis was based on 15 min of HR and RR interval (RRi) data recorded while the volunteer rested in the supine position. Statistical tests: chi-square, one-way ANOVA and multiple linear regression ($\alpha=5\%$). **Results:** The baseline characteristics and risk factors did not differ between the genotypes ($P>0.05$). There was no association between the ACE I/D polymorphism and the variables HR, BP and HRV ($P>0.05$). In the multiple regression analysis, a lower percentage of stenosis and the use of ACE inhibitors influenced higher RMSSD (ms) and HF (ms^2) indexes (69.24% and 58.40%, respectively). **Conclusion:** The results show that there is no relation between the ACE I/D polymorphism and the variables HR, BP and HRV. However, the higher HRV indexes, which reflect vagal autonomic modulation, are related to a lower percentage of stenosis and the use of ACE inhibitors.

Key words: heart rate variability; coronary disease; genetic polymorphism; angiotensin-converting enzyme.

1. Introduction

Coronary artery disease (CAD) is the main cause of death in Western populations and is associated with several changeable (smoking, hypertension, alcohol consumption, sedentary lifestyle, etc.) and non-changeable (age, gender, genetic background) risk factors [1-3]. These risk factors are linked to the development and progression of CAD [4, 5] and to disorders of the cardiac autonomic nervous system [6].

Among genetic factors, alterations in the nucleotide sequence of the gene that codifies the angiotensin converting enzyme (ACE) have been associated with increased risk of myocardial infarction and cardiomyopathies [7-10], left ventricular hypertrophy [11], coronary artery disease [12, 13] and alterations in cardiac autonomic modulation as determined by heart rate variability (HRV) analysis [14, 15].

The insertion/deletion (I/D) polymorphism of the ACE gene, found in intron 16, is characterized by the presence or absence (insertion and deletion alleles, respectively) of a sequence of 287bp. ACE is responsible for converting angiotensin I into angiotensin II, an important vasoconstrictor, and is involved in the degradation of bradykinin [16, 17]. Individuals who have both D alleles (DD genotype) present higher concentrations of circulating ACE [18].

Studies by Katsuya et al. [19] and Mittal et al. [20] report an association between the DD genotype, increased blood pressure levels and the development of hypertension. According to Murphey et al. [17] and Townend [21], such an association could be justified by the fact that higher levels of angiotensin II exert vagal inhibitory action and sympathetic facilitation in central and peripheral levels of the nervous system, influencing heart rate (HR) and blood pressure (BP) responses. Regarding the autonomic modulation of HR, Thayer et al. [15] observed that middle-aged individuals with risk factors for CAD presented an association between the DD genotype and lower vagal autonomic modulation. But in post myocardial infarction patients no association between the DD genotype and HRV indexes was verified in the acute phase [14]. However, Busjahn et al. [22] observed higher HRV indexes in healthy individuals with the DD genotype.

Considering the evidence, results regarding the association of the ACE gene polymorphism with the autonomic modulation of HR are controversial. Nevertheless, as far as we know the relation between the ACE I/D polymorphism with HRV indexes has not been dealt with in a population already at risk of CAD and presenting different degrees of the disease. Thus, based on the hypothesis that individuals with the DD genotype present higher sympathetic autonomic modulation and lower vagal modulation and that risk factors for the

development of CAD may be involved in the autonomic modulation of HR, the objectives of this study were to evaluate the relation between ACE I/D polymorphism and HR, BP and HRV indexes, as well as to evaluate the influence of risk factors on the HRV indexes of CAD patients.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

After signing the informed consent form, 151 male CAD patients (56±8 years) who had been diagnosed by coronary angiography were included in the study. Baseline characteristics, clinical characteristics and medications used are presented in Table 1 according to ACE gene I/D genotype (DD, n=54; ID, n=70 and II, n=27).

Inclusion and exclusion criteria

The study included volunteers with: medically diagnosed CAD (according to coronary angiography results) and coronary obstruction (from 20 to 99%) [23] in one to four arteries (including the anterior descending artery, left and right coronary artery, left circumflex artery, marginal and diagonal branches), myocardial infarction and angioplasty more than six months ago, myocardial revascularization surgery more than 12 months ago and at least one of the following risk factors: obesity (body mass index (BMI) up to 35 kg/m²), smoking [24], alcohol consumption [25], a weekly physical activity level classified as sedentary or irregularly active by the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) [26], a history of up to stage I hypertension [27], dyslipidemia including a high plasma concentration of total cholesterol (>200mg/dl), LDL cholesterol (>100mg/dl) and hypertriglycemia (>150mg/dl) or low HDL concentrations (<40mg/dl) [28], diabetes mellitus and fasting glycemia levels >110mg/dl [29].

The exclusion criteria included frequent arrhythmias and extrasystoles, obstructive pulmonary disease, angioplasty performed on the same day as coronary angiography, unstable angina, myocardial infarction in the previous six months, revascularization surgery in the previous 12 months, insulin-dependent diabetics, systemic hypertension higher than stage I, neoplasia, kidney failure, stroke sequelae and refusal to participate.

The study was approved by the Research Ethics Committee of the involved institution under protocol 04/09. The volunteers signed a free and informed consent form.

The sample size was calculated according to the lowest genotypic frequency of the ACE I/D polymorphism (genotype II) following Steeds et al. [14]. P= 0.01 with a margin of error of 10%, a power of 80% and a significance level of 5%. The sample size calculation was carried out using BioEstat 5.0, which suggested 38 volunteers.

2.2. Procedure and experimental protocol

HR and BP data were recorded between the 4th and the 7th days after coronary angiography in the research laboratory of the involved institution under climate-controlled conditions, including temperature and relative air humidity of approximately 23°C and 50%, respectively. The volunteers were instructed to avoid caffeine, alcohol and unnecessary exercise on the day before the test protocol. Immediately before the exams, the volunteers were questioned about whether they had carried out the foregoing instructions and were examined to verify the normality of HR and BP values.

Before data collection began, the volunteers remained resting in the supine position for a period of 10 min. Throughout the collection period, the volunteers were instructed to keep breathing spontaneously and with a respiratory frequency between 12 and 18 breaths per minute, which was monitored by a researcher. Beat-by-beat registration of HR and RR intervals (RRi) occurred continuously for 15 min with a Polar® frequency meter (model S810i: Polar Electro, Oy, Finland). This system detects ventricular depolarization, which corresponds to the R wave of the electrocardiogram, featuring a sample rate of 500Hz and a temporal resolution of 1 ms [30] and has been previously validated by Loimaala et al. [31] and Gamelin et al [32]. After recording, the signals were transferred to a computer for later analysis.

Resting blood pressure was measured with each of the following: the Korotkoff auscultatory method, a mercury sphygmomanometer (WanMed, São Paulo, SP, Brazil) and a stethoscope (Littman, St. Paul, MN, USA).

2.3. Data analysis

The mean value of the 15-min collection was used for analysis of resting HR, and the mean value of the measurements was used for BP analysis. A visual inspection of the distribution of the RRi (ms) of the electrocardiogram was carried out to select the 300-point section with the greatest signal stability (removing ectopic beats) for analysis.

The HRV analysis was carried out based on linear methods. In the time domain, the temporal indexes RMSSD (the square root of the mean squared differences of successive RRi divided by the number of RRi minus one, expressed in ms) and SDNN (root mean square of differences from mean R--R interval, divided by the number of RRi of the period selected [33]) were used. In the frequency domain, a non-parametric method involving fast Fourier transformation of the previously selected RRi was used. Using power spectrum components, very low frequency (VLF=0.003 to 0.04Hz), low frequency (LF=0.04 to 0.15 Hz) and high frequency (HF=0.15 to 0.4 Hz) signals were obtained, as was the ratio between absolute low-

frequency and high-frequency areas (LF/HF ratio). Normalization was carried out by dividing the absolute power of a given component ms^2 (LF or HF) by the total power spectrum, subtracting the VLF component and multiplying by 100. HF and LF bands represent the action of parasympathetic and predominantly sympathetic components of HR regulation, respectively [33, 34]. The data were analyzed in MATLAB 6.5 using the HRV analysis routine.

2.4. Genotyping (*ACE I/D polymorphism– rs1799752*)

The extraction of the genomic DNA was carried out using blood samples (5ml) obtained by venipuncture in vacuum tubes containing the anticoagulant ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), following the method described by Salazar et.al. [35]. The set of primers described by Rigat et al. [36] was used, namely: sense 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3', anti-sense 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC AGA T-3' and anti-sense 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3', whose final amplification product produces fragments with 490bp and 190bp for the I and D genotypes, respectively, and 490bp and 190bp for the ID genotype. The polymerase chain reaction (PCR) was processed in a final volume of 50 μL containing 150ng of genomic DNA, 3.0mM of MgCl_2 , 200 μM of each deoxyribonucleotide (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 10pmols of each primer, 0.5U of Taq polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil) and buffer DNA polymerase 1x (KCl at 50mM, Tris-HCl at 10mM, pH 8.4) (Invitrogen, São Paulo, Brazil). The PCR protocol (thermocycler T-Gradient, Whatman Biometra, Goettingen, Germany) consisted of a 5 min denaturation cycle at 95° C, followed by 30 annealing cycles at 94° C for 1 min, 58° C for 1 min and 72° C for 1 min, and finally a 10 min cycle at 72° C. The PCR products were separated in 1.5% agarose gel and visualized under ultraviolet light after staining with ethidium bromide. The genotyping of samples classified as DD was then confirmed (confirmatory PCR) using the set of primers: sense 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' and anti-sense 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3' [18]. No amplification product was observed in the presence of the DD genotype, whereas an amplification product of 355bp was seen in the presence of the ID genotype. The final volume and the concentrations of the reagents utilized in the reaction of the PCR were identical to those described above, except for the concentration of MgCl_2 , which was 2 mM. The amplification cycle was carried out as previously described, except that there were 40 cycles and the annealing temperature was 67° C. The PCR products were separated in agarose gel at 1.5% and visualized under ultraviolet light after coloration with ethidium bromide. The genotypes were confirmed by reanalysis of a random selection of 10% of the samples.

2.5. Statistical analysis

The allele frequencies were calculated using the gene counting method; the chi-square test was utilized to verify Hardy-Weinberg equilibrium according to the observed genotype frequencies. One-way ANOVA was used to analyze the baseline characteristics for age, anthropometrics, cardiovascular variables and biochemical blood tests. The chi-square test was used for dichotomous variables related to clinical characteristics and risk factors. One-way ANOVA was used to verify the association between the I/D polymorphism and the HRV indexes. A stepwise multiple linear regression [37] was used to verify the relation between the HRV indexes (dependent variables) and covariables (independent variables) such as: age, genotype characteristics (DD, ID and II), clinical characteristics (myocardial infarction > 6 months, myocardial revascularization > 12 months, stenosis percentage, number of arteries with stenosis), current medications acting on the cardiac autonomic nervous system (beta blockers and ACE inhibitors) and risk factors for CAD (smoking, alcohol consumption, dyslipidemia, diabetes mellitus, hypertension and obesity). The independent variables were selected by order of magnitude of the correlation coefficient with the dependent variables and their significance (P value). A minimum coefficient of determination of 50% and a variation of $r^2 < 0.05$ were established. A significance level of 5% was adopted for all tests. The data were analyzed using SPSS 13.0 for Windows (Apache Software Foundation).

3. Results

3.1. ACE genotype frequency

For the 151 CAD patients included in the study, the frequencies of the alleles D and I were 59% and 41%, respectively. The frequency of the genotypes DD, ID and II was 36% (n=54), 46% (n=70) and 18% (n=27), respectively. The frequency of the alleles and of the genotypes was in Hardy-Weinberg equilibrium ($X^2=0.80$; $P=0.66$).

3.2. Baseline characteristics, clinical characteristics and risk factors

The volunteers' demographic and clinical characteristics are presented in Table 1. There were no differences in age or anthropometric variables between ACE genotypes DD, ID and II ($P>0.05$). For biochemical and clinical variations, medications and risk factors, the values were similar between the different genotypes ($P>0.05$; Tables 1 and 2).

3.3. Cardiovascular variables

Table 3 presents the HR, BP and the HRV index values analyzed in the time and frequency domains for ACE genotypes DD, ID and II. The values were similar between the three genotypes for all variables analyzed ($P>0.05$).

3.4. Relation between risk factors and HRV indexes

Among all the co-variables evaluated with the HRV indexes, only the lowest stenosis percentage and the use of ACE inhibitors were related with the highest RMSSD (ms) and HF (ms^2) indexes, with coefficients of determination of 69.24 and 58.40%, respectively (Table 4). All of the obtained models satisfied the hypothesis of the homoscedasticity and normality of the residues.

4. Discussion

Our results show that there is no association between ACE I/D polymorphism and the risk factors for CAD. Furthermore, there was no relation between ACE I/D polymorphism and SBP, DBP and HR levels, or with the HRV levels analyzed in the time and frequency domains. Based on the regression analysis of the HRV indexes with the covariables analyzed (clinical characteristics and risk factors), it was evident that the highest RMSSD (ms) and HF (ms^2) index values are related to a lower degree of coronary stenosis and to the use of ACE inhibitors.

Previous studies carried out with different populations have shown a high prevalence of risk factors in patients with DD genotypes and in those with ischemic heart diseases [38-40]. However, in this investigation such a relationship could not be verified, which corroborates other studies that have found no association between ACE I/D polymorphism and risk factors for coronary artery diseases [19, 41, 42]. In fact, the presence of classic CAD risk factors is quite unstable, being influenced by environmental and behavioral components and varying considerably between populations.

In our study, the variables SBP and DBP apparently were not influenced by ACE I/D polymorphism. Cambien et al.[7], Staessen et al. [43] and Lui Li et al. [44] reported that even though the D allele has been considered a marker of atherosclerotic cardiovascular complications, no association could be found between ACE I/D polymorphism and hypertension. On the other hand, Katsuya et al. [19], Mittal et al. [20] and Mastana and Nunn [45] have evaluated the potential influence of ACE I/D polymorphism in patients with metabolic syndrome, hypertension and diabetes, respectively, and observed that SBP and DBP were significantly higher in the DD genotype than the ID and II genotypes. These authors attribute their findings to the high levels of ACE resulting from the DD genotype, may lead to an increase of angiotensin II and exacerbated vasoconstriction, thus elevating the BP.

Our study found no relation between ACE I/D polymorphism and HR and the HRV indexes in the time and frequency domains. The ACE I/D polymorphism can affect HR

response, although without necessarily influencing the autonomic modulation of HR. Steeds et al. [14] evaluated patients approximately 30 days after AMI and also found no association between I/D polymorphism of the ACE gene and HRV. Ylitalo et al. [46] evaluated young healthy individuals and also found no relation between the DD genotype and HRV. A number of studies have indicated that from 12 to 65% of the HRV variation may be attributed to the influence of polymorphism on cardiac autonomic nervous system responses [22, 47, 48]. On the other hand, Nikishino et al. [49] found no relation between the DD genotype and higher LF indexes in young adults during the postural change test.

In our study, the lack of association between ACE I/D polymorphism and HRV may be partly due to the great variation in important associated risk factors, such as CAD, that influence the autonomic modulation of HR. In addition, it should be pointed out that the stage of the disease, the percentage of coronary stenosis and the use of medication are known to be highly related to HRV indexes [50].

In the present study, linear regression demonstrated that the severity of CAD, represented by coronary stenosis $\geq 50\%$, is associated with lower RMSSD and HF indexes, which represent vagal autonomic modulation. Similar results have been observed in previous studies [50-52]. The increase of sympathetic tonus and the reduction of parasympathetic tonus may be due to increased demand for ventricular work and oxygen supply, causing modifications in ionic currents through the cell membrane. This could lead to electrical instability in the cardiomyocytes due to the degree and the number of obstructed arteries [53].

In addition, the use of medications such as ACE inhibitors and beta blockers also influences HRV response, since such medications are used to reduce cardiac work demand, BP and HR, as well as to reduce the incidence of new cardiac events and mortality rates [54, 55].

Our results indicate that ACE inhibitors had a significant influence on the response of the RMSSD (ms) and HF (ms^2) indexes. Thus, reducing the concentration of angiotensin II by means of medication would influence arterial baroreceptor reflex activity, generating a reduction of sympathetic activity and an increase of vagal activity [46, 56].

Another factor to be considered is age. Previous studies have verified that there is an increase in angiotensin II levels with advancing age [57]. Therefore, age associated with the presence of disease and the use of medications could have contributed to the lack of association between ACE I/D polymorphism and the phenotypes evaluated in this study. These results do not exclude the hypothesis that ACE I/D polymorphism could contribute to

autonomic modulation and thus partially explain a possible mechanism involved in HR modulation and BP control.

Some limitations should be mentioned, such as the lack of a control group and the non-quantification of circulating levels of ACE and angiotensin II. Furthermore, studies considering the evaluation of other polymorphisms related to the renin-angiotensin system could have interesting results, considering that they are part of the same metabolic path.

In light of the above, there is no association between ACE I/D polymorphism with the HR and BP phenotypes and HRV indexes of patients with CAD. On the other hand, the percentage of stenosis and the use of medications such as ACE inhibitors interfered in the vagal autonomic modulation of the HR.

Acknowledgements

The authors would like to thank Drs. Eduardo Nicolela Junior and Humberto Magno Passos for allowing patient triage, carrying out all the coronary angiographies, and making the Serviço de Hemodinâmica of Emcor available for conducting some of the experiments in this study.

The authors of this manuscript have certified that they comply with the Principles of Ethical Publishing in the International Journal of Cardiology.

References

- [1] Talbert RL. Ischemic heart disease. In: DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, eds. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. 6th ed. New York: Elsevier; 2005: 219-250.
- [2] Loos RJ, Katzmarzyk PT, Rao DC, et al. Genome-wide linkage scan for the metabolic syndrome in the HERITAGE Family Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5935–5943.
- [3] Liao D, Sloan RP, Cascio WE, et al. Multiple metabolic syndrome is associated with lower heart rate variability. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes Care* 1998; 21: 2116–2122.
- [4] Huikuri HV, Jokinen V, Syvanne M, et al. Heart rate variability and progression of coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1979-85.
- [5] Liao D, Cai J, Rosamond JC, et al. Cardiac autonomic function and incident coronary heart disease: a population-based case-cohort study. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 696-706.
- [6] Thayer JF, Yamamoto SS, Brosschot JF. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. *Inter J Cardiol* 2010; 141: 122-131.

- [7] Cambien F, Poirier O, Lecerf L, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359: 641-644.
- [8] Raynolds MV, Bristow MR, Bush EW, et al. Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1993; 342: 1073-1075.
- [9] Marian AJ, Yu Q-T, Workman R, Greve G, Roberts R. Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *Lancet* 1993; 342: 1085-1086.
- [10] Petrovic D, Bregar D, Guzic-Salobir B, et al. Sex difference in the effect of ACE-DD genotype on the risk of premature myocardial infarction. *Angiology* 2004; 55: 155–8.
- [11] Schunkert H, Hense H-W, Holmer SR, et al. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 1994; 330: 1634-1638.
- [12] Nakai K, Itoh C, Miura Y, et al. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation* 1994; 90: 2199-2202.
- [13] Unger T. The role of the renin– angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2002; 89: 3A–9A.
- [14] Stedds RP, Fletcher J, Parry H, et al. The angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and heart rate variability following acute myocardial infarction. *Clin Auton Res* 2002; 12: 66-71.
- [15] Thayer JF, Merritt MM, SollersJJ, et al. Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism DD Genotype on High-Frequency Heart Rate Variability in African Americans. *Am J Cardiol* 2003; 92: 1487–1490.
- [16] Cicoira M, Zanolla L, Rossi A, et al. Failure of aldosterone suppression despite angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor administration in chronic heart failure is associated with ACE DD genotype. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1808-12.
- [17] Murphey LJ, Gainer JV, Vaughan DE, Brown NJ. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism modulates the human in vivo metabolism of bradykinin. *Circulation* 2000; 102: 829-32.
- [18] Darrell R. Abernethy, Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl-carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res* 1992; 20:1433.
- [19] Katsuya T, Horiuchi M, Chen YD, et al. Relations between deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and insulin resistance, glucose intolerance, hyperinsulinemia, and dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 779-782.

- [20] Mittal G, Gupta V, Haque SF, Khan AS. Effect of angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism in patients with metabolic syndrome in North Indian population. *Chin Med J* 2011; 124(1): 45-48.
- [21] Townend JN. Angiotensin II as a modulator of cardiovascular autonomic control. *Cardiologia* 1995; 41(3): 217–225.
- [22] Busjahn A, Voss A, Knoblauch H, et al. Angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms and heart rate variability in twins. *Am J Cardiol* 1998; 81: 755–760.
- [23] Cesar LAM, Dir Mansur AP, Armaganijan D, et al. Diretrizes de Doença Coronariana Crônica-Angina Estável. *Arq Bras Cardiol*. 2004; 83, Sup II: 1-43.
- [24] Iglesias R, Jha P, Pinto M, Silva VLC, Godinho J. Controle do tabagismo no Brasil. Ministério da Saúde, Brasil; 2007.
- [25] Gaziano JM, Hennekens C. Royal colleges' advice on alcohol consumption: maintaining existing limits seems justified on current evidence. *Br Med J* 1995; 311(6996): 3-4.
- [26] Hallal PC, Victora CG. Reliability and validity of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ). *Med Sci Sports Exerc*. 2004; 36(3):556.
- [27] Mion Jr D, Kohlmann Jr O, Machado CA, et al. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol* 2007; 89(3): e24-79.
- [28] Sposito AC, Carameli B, FonsACE FAH, et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose *Arq Bras Cardiol* 2007; 88: 1-19.
- [29] Tambascia MA, Gomes MB, Dib SA, et al. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. 2007; 1-168.
- [30] Ruha A, Sallinen S, Nissila S. A real-time microprocessor QRS detector system with a 1-ms timing accuracy for the measurement of ambulatory HRV. *IEE Trans Biomed Eng* 1997; 44(3): 159-67.
- [31] Loimaala A, Sievanen H, Laukkanen R, Parkka J, Vuori I, Huikuri H. Accuracy of a novel real-time microprocessor QRS detector for heart rate variability assessment. *Clin Physiol* 1999; 19: 84–88.
- [32] Gamelin FX, Berthoin S, Bosquet L. Validity of polar S810i heart rate monitor to measure R-R intervals at rest. *Med Sci Sports Exerc* 2006; 38(5): 887-93.
- [33] Task Force of the European Society of Cardiology, and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur Heart J* 1996; 17: 354–381.
- [34] Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 1991; 84: 482-492.

- [35] Salazar LA, Hirarta MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RD: Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem* 1998; 44 (8 Pt 1): 1748-1750.
- [36] Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, et al. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86(4): 1343–1346.
- [37] Neter J, Wasserman W, Kutner MH, Nachtshein CJ. *Applied Linear Statistical Models*. McGraw Hill 1996; 490p.
- [38] Seckin D, Ilhan N, Ilhan N, Ozbay Y. The relationship between ACE insertion/deletion polymorphism and coronary artery disease with or without myocardial infarction. *Clin biochem* 2006; 39:50-4.
- [39] Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, Channer K, Woods KL. A metaanalysis of the association of the deletion allele of the angiotensin converting enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation* 1996; 94: 708-12.
- [40] Reddy PB, Babu SBMV, Karunakar KV, et al. Angiotensin-converting enzyme gene variant and its levels: risk factors for myocardial infarction in a South Indian population. *Singapore Med J* 2010; 51(7): 576.
- [41] Pfohl M, Koch M, Prescod S, et al. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism, coronary artery disease and myocardial infarction. *Eur Heart J* 1999; 20: 1318-25.
- [42] Araújo MA, Goulart LR, Cordeiro ER, et al. Genotypic interactions of renin-angiotensin system genes in myocardial infarction. *Inter J Cardiol* 2005; 103: 27-32.
- [43] Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, et al. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens* 1997; 15: 1579-1592.
- [44] Liu LW, Liu H, Chen GL, et al. Angiotensin-converting enzyme gene I/D genotype affected metoprolol-induced reduction in 24-hour average heart rate. *Chin Med J* 2010; 123(11): 1382-1386.
- [45] Mastana S, Nunn J. Angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism is associated with hypertension in a Sikh population. *Hum Hered* 1997; 47: 250-253.
- [46] Ylitalo A, Airaksinen JKE, Hautanen A, et al. Baroreflex sensitivity and variants of the rennin angiotensin system genes. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 194-200.
- [47] Singh JP, Larson MG, O'Donnell CJ, Levy D. Genetic factors contribute to the variance in frequency domain measures of heart rate variability. *Auton Neurosci* 2001; 90: 122–126.
- [48] Uusitalo ALT, Vanninen E, Levalahti E, Battié MC, Videman T, Kaprio J. Role of genetic and environmental influences on heart rate variability in middle-aged men. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H1013-H1022.

- [49] Nishikino M, Matsunaga T, Yasuda K, et al. Genetic variation in the rennin-angiotensin system and autonomic nervous system function in young healthy japanese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4676-4681.
- [50] Kunz VC, Souza RB, Takahashi ACM, Catai AM, Silva E. The relationship between cardiac autonomic function and clinical and angiographic characteristics in patients with coronary artery disease. *Rev Bras Fisioter* 2011; 15(6): 503-510.
- [51] Huikuri HV, Makukallio TH. Heart rate variability in ischemic heart disease. *Auton Neurosci* 2001; 90: 95-1001.
- [52] Vaccarino V, Lampert R, Bremner JD, et al. Depressive symptoms and heart rate variability: evidence for a shared genetic substrate in a study of twins. *Psychosom Med* 2008; 70: 628-36.
- [53] La Rovere MT, Bigger Jr JT, Marcus FI, et al. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *Lancet* 1998; 351(9101): 478-84.
- [54] Dibner-Dunlap ME, Smith ML, Kinugawa T, et al. Enalapril at augments arterial and cardiopulmonary baroreflex control of sympathetic nerve activity in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 358-64.
- [55] Lewandowski J, Abramczyk P, Dobosiewicz A. The effect of enalapril and telmisartan on clinical and biochemical indices of sympathetic activity in hypertensive patients. *Clin Exp Hypertens* 2008; 30(5): 423-32.
- [56] Yu U, Zhang Y, Lui G. Relationship between Polymorphism of the Angiotensin-Converting Enzyme Gene and the Response to Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition in Hypertensive Patients. *Hypertens Res* 2003; 26: 881–886
- [57] Brooks VL, Osborn JW. Hormonal-sympathetic interactions in long-term regulation of arterial blood pressure: an hypothesis. *Am J Physiol* 1995; 268: R1343–R1358.
- [58] Shewan LG, Coats AJ. Statement on Authorship and Publishing Ethics in the International Journal of Cardiology. *Int J Cardiol* 2011; 153(3): 239-40.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of ACE genotypes DD, ID and II.

Variables	DD (n=54)	ID (n=70)	II (n=27)	P
Age (years)	57±7	55±6	58±7	0.11
Body mass (kg)	80.35±12.87	82.44±15.07	83.96±15.95	0.71
Height (cm)	170.80±6.49	169.80±6.83	172.15±7.34	0.26
BMI (kg/m ²)	27.34±3.74	28.66±4.92	27.34±4.40	0.35
Biochemical tests				
Glycemia (mg/dl)	102.80±32.57	98.87±28.72	97.67±38.85	0.37
Total Cholesterol (mg/dl)	179.76±50.00	178.40±37.14	170.89±35.93	0.65
HDL (mg/dl)	38.69±8.25	39.76±10.88	41.00±8.42	0.21
LDL (mg/dl)	110.30±37.81	99.11±25.41	102.63±30.65	0.64
Triglycerides (mg/dl)	152.52±85.01	151.19±75.86	145.00±84.03	0.75
Clinical Characteristics				
	N (%)	N(%)	N(%)	
Myocardial infarction (>6 months)	7(13)	7(10)	5(19)	0.54
Myocardial revascularization (>12 months)	3(6)	3(5)	1(4)	0.91
Angioplasty (>6 months)	7(13)	7(10)	4(15)	0.77
Stenosis percentage				
Stenosis ≥50%	30(56)	40(57)	13(48)	0.73
Stenosis <50%	24(44)	30(43)	14(52)	0.73
Number of diseased vessel				
One diseased vessel	27(50)	33(47)	12(44)	0.95
Two diseased vessels	12(22)	20(29)	3(11)	0.99
Three diseased vessels	15(28)	17(24)	12(44)	0.15
Medications				
Beta blockers	20(37)	19(27)	7(30)	0.42
ACE inhibitors	21(39)	19(27)	9(33)	0.38
Lipid-lowering	22(41)	28(40)	10(37)	0.94
Glycemia-lowering	4(7)	7(10)	5(19)	0.33
Diuretics	9(17)	9(13)	6(22)	0.52
Antiplatelet	31(57)	32(46)	11(41)	0.27

BMI= body mass index; HDL=high density lipoprotein; LDL= low density lipoprotein; mg/dl=milligrams per deciliter; ACE=angiotensin converting enzyme. Values expressed as mean and standard deviation and in number and percentage. One-way ANOVA test for quantitative data and chi-square test for qualitative data.

Table 2. Number and percentage of family history and risk factors for CAD according to ACE genotypes DD, ID and II.

	DD (n=54)	ID (n=70)	II (n=27)	p value
Family History	n (%)	n (%)	n (%)	
Family history of hypertension	14(26)	21(30)	8(30)	0.87
Family history of CAD	26(48)	23(33)	8(30)	0.13
Family history of diabetes	23(25)	37(53)	16(60)	0.22
Family history of dyslipidemia	24(44)	21(30)	6(22)	0.09
Family history of obesity	9(17)	14(20)	7(26)	0.61
Risk factors				
Smoking	5 (9)	3(4)	4(15)	0.20
Alcohol consumption	24 (44)	29(41)	10(37)	0.81
Dyslipidemia	32(59)	43(61)	12(44)	0.30
Diabetes mellitus	14(26)	21(30)	8(30)	0.97
Hypertension	35(65)	33(47)	11(41)	0.06
Obesity	8(15)	16(23)	5(19)	0.52

CAD=coronary artery disease; Cutoff values: Family history (presence or absence); Values expressed as number and percentage. Chi-square test.

Table 3. I/D polymorphism of the ACE gene and cardiovascular variables.

		DD (n=54)	ID (n=70)	II (n=27)	p value
	HR (bpm)	65±10	69±12	67±13	0.23
	SBP (mmHg)	127±12	123±11	122±12	0.07
	DBP (mmHg)	80±6	81±7	80±10	0.75
Time	RMSSD (ms)	21.73±11.78	20.08±11.43	19.92±19.95	0.68
Domain	SDNN (ms)	29.59±12.09	27.54±13.45	25.25±11.03	0.33
	LF (ms ²)	305.35±335.50	303.33±376.04	208.51±222.92	0.41
Frequency	HF (ms ²)	190.17±183.22	185.35±191.50	153.16±161.15	0.67
Domain	LF (un)	59.62±21.53	61.47±17.71	57.21±21.52	0.55
	HF (un)	40.38±21.53	38.49±17.71	42.79±21.52	0.55
	LF/HF	2.27±1.69	2.49±2.47	2.00±1.60	0.58

RMSSD = the square root of the mean squared differences of successive RRinterval divided by the number of RRi minus one; SDNN = root mean square of differences from mean RR interval, divided by the number of RRi of the period selected; LF= low frequency; HF= high frequency; LF/HF= ratio between low frequency and high frequency; ms²= absolute units in milliseconds squared; un= normalized units; DD= homozygote for the DD allele; ID= heterozygote; II=homozygote for the I allele. Values expressed as mean and standard deviation. One-way ANOVA test.

Table 4. Linear regression between co-variables and heart rate variability indexes

	Stenosis percentage			ACE inhibitors		R ²
	intercept	estimative	p value	estimative	p value	
RMSSD (ms)	27.69	-10.79	<0.01	11.84	<0.01	69.24%
SDNN (ms)	30.08	-10.55	<0.01	10.31	<0.01	43.11%
LF (ms ²)	177.58	-176.53	<0.01	241.32	<0.01	27.18%
HF (ms ²)	280.35	-158.61	<0.01	194.84	<0.01	58.40%
LF (nu)	0.40	0.09	<0.01	-0.07	<0.01	28.59%
HF (nu)	0.59	-0.09	<0.01	0.07	<0.01	28.42%
LF/AF	0.92	1.06	<0.01	0.07	<0.01	19.88%

R²= determination coefficient; RMSSD= the square root of the mean squared differences of successive R-Ri divided by the number of R-Ri minus one; SDNN= square root of the sum of the square of differences of the individual values compared to the mean value, divided by the number of R-R intervals in a period; LF= low frequency; HF= high frequency; LF/HF= ratio between low frequency and high frequency; ms²= absolute units in milliseconds squared; nu= normalized units. Multiple linear regression.