

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**AVALIAÇÃO DO CONTROLE AUTONÔMICO DA PRESSÃO E FREQUÊNCIA
CARDÍACA E DO ESTRESSE OXIDATIVO DE RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM INIBIDOR DA ENZIMA
CONVERSORA DA ANGIOTENSINA**

KARINA RABELLO CASALI

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen

Co-Orientadora: Profa. Dra. Katya Vianna Rigatto

Co-orientador no exterior: Prof. Dr. Nicola Montano

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,
área de concentração: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biológicas – Fisiologia.**

Porto Alegre, 2009.

"Não se pode montar em um cavalo sem cavalgar sua sombra"

-Alberto Malliani- "L'Ombra delle Parole"

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Maria Cláudia, pela confiança e orientação.

À minha co-orientadora Katya pelo apoio, amizade e aprendizado.

À professora Adriane pelo exemplo diário de pesquisadora.

Aos amigos do laboratório, pelos ensinamentos e momentos agradáveis divididos.

À pós-graduação que proporcionou o ambiente necessário para meu crescimento na área de fisiologia e para a realização desta tese.

Aos professores desse departamento, em especial às professoras Maria Flávia e Ilma.

Ao grupo de pesquisa italiano, em especial ao eng. Alberto Porta.

Ao meu orientador no exterior e amigo Nicola, por todas as lições de fisiologia e vida.

Aos meus queridos amigos italianos, em especial à Ele minha parceira de trabalho e grande amiga.

À minha família, em especial ao meu primo Cleber pelo incentivo desde a graduação.

Aos meus sogros queridos e à minha cunhada do coração.

Às minhas irmãs Bibi e Lu pelo companheirismo e amor.

Aos meus pais Nice e Ari pela minha essência.

Ao meu marido Adenauer por tudo que somos juntos.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 HIPERTENSÃO	1
1.2 MODELO ANIMAL DE HIPERTENSÃO	2
1.3 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA E HIPERTENSÃO	2
1.4 HIPERTENSÃO, HIPERTROFIA CARDÍACA E ESTRESSE OXIDATIVO.	5
1.5 CONTROLE AUTÔNOMICO E HIPERTENSÃO.....	6
1.6 AVALIAÇÃO DO CONTROLE AUTÔNOMICO: MODULAÇÃO DA FC E PA	7
2. HIPÓTESE.....	13
3. OBJETIVOS.....	14
4. MÉTODOS.....	15
4.1. ANIMAIS	15
4.2. TRATAMENTO COM IECA.....	15
4.3. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	16
4.4. REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL	17
4.5. CONSTRUÇÃO DAS SÉRIES TEMPORAIS	17
4.6. AVALIAÇÃO DO CONTROLE AUTÔNOMICO – ANÁLISE ESPECTRAL	17
4.7. AVALIAÇÃO DO CONTROLE AUTÔNOMICO – ANÁLISE BIDIMENSIONAL DE IRREVERSIBILIDADE TEMPORAL	18
4.8. ESTIMATIVA DA MODULAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA – ANÁLISE ESPECTRAL	20
4.9. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE BAROREFLEXA – ANÁLISE ESPECTRAL	20
4.10. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS CARDÍACAS - PREPARO DO TECIDO	20
4.11. MEDIDAS DE DANO OXIDATIVO.....	21
4.12. MEDIDA DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	21
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
6. RESULTADOS	24
6.1. ARTIGO 1	25
6.2. ARTIGO 2	33
6.3. ARTIGO 3	52
7. DISCUSSÃO CONCLUSIVA.....	77
8. PERSPECTIVAS	84
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de análise de irreversibilidade utilizando o teste bidimensional múltiplo.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang II	angiotensina II
AR	auto-regressivo
ARA	antagonista do receptor AT1
AT1	receptor da angiotensina I
CAT	catalase
EAO	espécies ativas de oxigênio
ECA	enzima conversora da angiotensina
FC	freqüência cardíaca
GPX	glutathiona peroxidase
HF	freqüência alta
IBM	irreversibilidade bidimensional múltipla
IE	irreversibilidade estatística
iECA	inibidor da enzima conversora da angiotensina
LF	freqüência baixa
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PA	pressão arterial
PAS	pressão arterial sistólica
SHR	ratos espontaneamente hipertensos
SNA	sistema nervoso autonômico
SNS	sistema nervoso simpático
SOD	superóxido dismutase
SRA	sistema renina-angiotensina
VFC	variabilidade da freqüência cardíaca
VLf	freqüência muito baixa
VPAS	variabilidade da pressão arterial sistólica

RESUMO

Este trabalho testa a hipótese de que a inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA), mesmo em doses baixas que não causam alteração de pressão, é capaz de influenciar nos processos de hipertrofia cardíaca, estresse oxidativo e controle autonômico em animais espontaneamente hipertensos (SHR). Os animais foram tratados com um inibidor da enzima conversora da angiotensina (iECA) e foram quantificados a hipertrofia e o estresse oxidativo cardíacos. Também foi avaliado o controle autonômico através da análise espectral de séries temporais de pressão arterial sistólica e frequência cardíaca. Além disso, foram investigadas as características não-lineares das séries de frequência cardíaca envolvidas na hipertensão arterial sistêmica e o efeito do tratamento sobre estes parâmetros através de um teste de irreversibilidade desenvolvido para detectar dinâmicas não-lineares independentemente da escala temporal de ação. Neste contexto, o primeiro estudo (artigo 1) objetivou o desenvolvimento do novo método para análise de irreversibilidade estatística (IE) capaz de detectar inclusive a presença de dinâmicas não-lineares mais lentas das observadas pelos métodos tradicionais. A nova técnica, denominada irreversibilidade bidimensional múltipla (IBM), foi validada e mostrou-se útil quando aplicada a séries fisiológicas exibindo um padrão de não-linearidade aumentado em situações de predominância simpática. No segundo momento (artigo 2) o novo método foi aplicado a séries temporais de frequência cardíaca em situações em que a ativação simpática foi provocada. Após demonstrar a associação entre a irreversibilidade e a modulação simpática em situação fisiológica, usando um protocolo de estimulação simpática gradual, o método também foi aplicado a uma situação patológica, caracterizada pela hipertensão espontânea em ratos. Nesta situação, houve um aumento da IE e o mecanismo não-linear envolvido na referida patologia possui ação mais lenta, sendo possível de ser detectado apenas com o uso de técnicas de alta dimensionalidade, como a irreversibilidade bidimensional múltipla. Além disso, foi verificado o efeito do tratamento com iECA, que reduziu a modulação simpática e restaurou o padrão de irreversibilidade a percentuais semelhantes aos do grupo controle. O terceiro estudo (artigo 3) teve como objetivo avaliar o efeito da inibição da ECA sobre a hipertrofia cardíaca, estresse oxidativo e controle autonômico em doses não anti-hipertensivas. Os resultados demonstraram uma redução da hipertrofia cardíaca, do estresse oxidativo cardíaco, mesmo sem alterar a pressão arterial. Apesar de não alterar a modulação simpática vascular ou atuar na sensibilidade baroreflexa, o tratamento em baixa dose melhorou o balanço autonômico, em favor da modulação vagal. Tais resultados podem indicar uma ação central que busca restabelecer o equilíbrio cardiovascular, precedente à alteração de pressão. Assim sendo, o presente estudo poderá contribuir no desenvolvimento de novas estratégias que, num futuro próximo, permitirão não só avaliar os efeitos do tratamento, mas principalmente, prevenir o estabelecimento de novos quadros hipertensivos e de insuficiência cardíaca.

ABSTRACT

This work presents the hypothesis that inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE), even in low doses that do not cause decrease of pressure, is able to alter the cardiac hypertrophy, the oxidative stress and the autonomic control in spontaneously hypertensive rats (SHR). To evaluate cardiac oxidative stress and its hypertrophy, animals were treated with an angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEi). Also the autonomic control was analyzed by the spectral analysis of systolic arterial pressure and heart rate series. Besides, non-linear characteristics present in hypertension and the ACEi treatment effect were also evaluated by an irreversibility test developed to detect non-linear dynamics independently of their temporal scale. The first study (article 1) aimed at developing a new method for analysis of statistical irreversibility (SI) which was able to detect the presence of non linear dynamic including those that were slower than the ones observed by traditional methods. The new technique, called multiple bi-dimensional irreversibility (MBI), was validated and showed to be useful when applied to physiological series, presenting an increased non linear pattern increased in situations with sympathetic predominance. This new method was also applied to time series of heart rate in situations of sympathetic activation (article 2). After the demonstration of an association between irreversibility and sympathetic modulation in a physiological condition, the method was applied to a pathological situation, in SHR. SHR data showed that there was an increase of SI. Furthermore, the non-linear mechanism wrapped in this pathology has slower action, which can be detected only with the use of multidimensional techniques, as MBI. Besides, the ACEi treatment resulted in a reduction of the sympathetic modulation and restored the irreversibility pattern to those similar to control. Finally, the third study (article 3) evaluates the effect of ACEi on the cardiac hypertrophy, oxidative stress and autonomic control in no anti-hypertensive doses. The results demonstrated a cardiac hypertrophy and cardiac oxidative stress reduction, with no alteration of blood pressure. In spite of producing no alteration in the sympathetic vascular modulation or no action in the baroreflex sensibility, the low dose of ACEi treatment improved the autonomic balance, in favour of vagal modulation. Such results can indicate a central action to re-establishing the cardiovascular balance, preceding to the pressure alterations. Thus, the present study may help to the new strategies development to treat and, mainly, to prevent the establishment of hypertension and of heart failure.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão

Segundo dados disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (DataSUS), em 2005, 29% do total de mortes no Brasil foram devido a doenças do aparelho circulatório, dentre as quais as doenças cérebro vasculares e as doenças isquêmicas do coração, ambas fortemente associadas à hipertensão arterial sistêmica, foram consideradas as causas de maior impacto.

A hipertensão arterial sistêmica é caracterizada por um aumento sustentado da pressão arterial (PA) que, de forma crônica, desencadeia uma série de mecanismos compensatórios acompanhados de ajustes que podem incluir aumento do estresse oxidativo, indução de hipertrofia cardíaca e dano endotelial, evoluindo para insuficiência cardíaca e renal.

Dentre os tratamentos mais utilizados para controlar a hipertensão arterial sistêmica estão os diuréticos, os antagonistas de canal de cálcio, os antagonistas do receptor AT1 (ARA), os inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina (iECA) e os antagonistas dos receptores de mineralocorticóides; e ainda outros fármacos em fase de testes, tais como os inibidores da renina. Os agentes anti-hipertensivos utilizados no tratamento da hipertensão possuem mecanismos de ação diferentes e, além de suas propriedades em reduzir a PA, agem sobre o organismo causando efeitos cardiovasculares e sistêmicos.

1.2 Modelo animal de hipertensão

Um modelo experimental de hipertensão arterial sistêmica muito utilizado em diferentes estudos é o da hipertensão espontânea em ratos (SHR). Estes animais apresentam características fenotípicas muito semelhantes às observadas na hipertensão essencial ou primária humanos. Tais animais, à semelhança dos seres humanos, apresentam um período pré hipertensivo, seguido de um período de sobrecarga pressórica sustentada, que caracteriza o estabelecimento da hipertensão, cuja conseqüente tardia é a insuficiência cardíaca (Okamoto e Aoki, 1963; Bell et al., 2004).

Um estudo avaliando o curso temporal da patologia neste modelo (Bell et al., 2004) demonstrou que a pressão arterial nestes animais aumenta a partir da sétima até a décima sexta semana de vida, quando então atinge a fase da hipertensão arterial sistêmica sustentada. Nesta fase de alteração da pressão, os SHR passam a desenvolver a hipertrofia cardíaca de forma compensatória sendo que, após a décima oitava semana, se estabelece um quadro de insuficiência cardíaca grave acompanhada de déficit mecânico e de contratilidade, dilatação das câmaras e fibrose cardíaca (Bing et al., 2002).

1.3 Sistema Renina Angiotensina e Hipertensão

A utilização de fármacos que intervêm sobre o sistema renina angiotensina (SRA) corresponde à opção de tratamento com bons resultados na melhora do quadro hipertensivo, com ações benéficas tanto locais como sistêmicas. Dentre eles estão os ARA que agem evitando a seqüência de efeitos vasoconstritores e hipertensivos decorrentes da ligação da Angiotensina II (Ang II) ao seu receptor AT1. O Losartan, um dos ARA mais utilizados, apresenta um importante efeito em reduzir a PA tanto em ratos SHR quanto em pacientes com hipertensão essencial (YU et al., 2001; Omvik et al., 2000), melhorando a resposta baroreflexa (Kawano et al., 1994) e reduzindo a hipertrofia

cardíaca (Doggrell et al., 2003; Mizuno et al., 1992; Yu et al., 2001). Além disso, o tratamento com ARA também pode melhorar a função endotelial e reduzir o estresse oxidativo cardíaco (YAO et al., 2007), associado ao desequilíbrio redox observado na hipertensão arterial sistêmica (Touyz, 2004).

Outra família de fármacos muito usados no tratamento da hipertensão arterial sistêmica e que também inibem o SRA é a dos os inibidores da enzima conversora da Angiotensina (ECA). Tal estratégia terapêutica inibe a formação dos peptídeos obtidos pela ação da ECA, sobretudo a Angiotensina II, e apresenta efeitos benéficos significativos no tratamento da hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e doença coronariana (LÉVY, 2006). Estudos experimentais e clínicos apontam uma série de benefícios com o uso dos iECA. Além de sua ação em reduzir a PA, o tratamento com iECA diminui a atividade simpática eferente (Montano et al., 1993), melhora o balanço autonômico em ratos idosos (Dias da Silva et al., 2006) e melhora a sensibilidade baroreflexa em ratos (Ichikawa et al., 1995) e em humanos (Williams and Kim, 2003) hipertensos ou com insuficiência cardíaca (Osterziel et al., 1988; Osterziel et al., 1990). Além disso, o tratamento com iECA ainda reduz a produção de EAO (Portero-Otina et al., 2008), através da redução da biodisponibilidade de Ang II e possivelmente através do aumento da ativação do receptor de bradicinina (Allard et al., 2007; Couture et al., 2004). Sabe-se que a ligação da Ang II ao seu receptor AT1 também é responsável pelo aumento do estresse oxidativo (Nickenig e Harrison, 2002) e isso explicaria, pelo menos parcialmente, o efeito antioxidante tanto dos iECA como dos ARA.

Além disso, estudos clínicos e farmacológicos que avaliam os efeitos da iECA, têm evidenciado uma ação central da Angiotensina II capaz de causar danos cardiovasculares e renais independentemente de sua ação hipertensora (Timmemans et al., 1993; Kim and Iwao, 2000; Weir and Dzau, 1999). Dessa forma, seria possível esperar

um efeito benéfico da intervenção sobre o SRA na modulação do SNA sobre a atividade cardiocirculatória independente da ação sobre a redução da PA. De fato, alguns estudos feitos com doses de iECA insuficientes para provocar queda da PA, mostraram uma regressão da massa cardíaca em ratos hipertensos (Linz et al., 1989; Gasparo et al., 2000). Entretanto esse efeito independente da redução da pressão ainda não está totalmente compreendido.

Avaliando ratos com hipertensão renovascular, Matsubara e colaboradores (1999) verificaram um efeito preventivo do tratamento com iECA em baixas doses sobre a fibrose e necrose do miocárdio e dano da artéria coronária. Porém, ao contrario da literatura em geral, neste estudo os autores não encontraram efeitos dos iECA sobre a hipertrofia cardíaca.

Na hipertensão arterial sistêmica observa-se uma predominância da ativação simpática versus a parassimpática sobre o controle da FC, caracterizando um foco de interesse no tratamento da hipertensão, independente das alterações dos níveis pressóricos. De fato, Franchi e colaboradores (2002) verificaram um efeito benéfico sobre o controle autonômico da FC após o tratamento com irbesartan, mesmo sem alteração na pressão arterial média. No mesmo estudo, o tratamento com baixas doses de um iECA (trandolapril) também mostrou melhora na modulação autonômica, mas esse efeito não pode ser considerado independente da pressão, pois a dose, mesmo baixa, causou redução da pressão arterial média diurna. Apesar do tratamento com iECA muitas vezes apresentar ações benéficas ao organismo, não existem evidências conclusivas sobre o seu mecanismo de ação. Seu poder terapêutico no quadro hipertensivo nem sempre está relacionado à redução da PA indicando que outros mecanismos estão envolvidos neste processo, após a atenuação/inibição do SRA.

1.4 Hipertensão, Hipertrofia Cardíaca e Estresse Oxidativo.

A hipertrofia cardíaca consiste de um processo de remodelamento tecidual em resposta ao aumento do trabalho cardíaco. A adaptação inicial busca normalizar a função ventricular e compensar o estresse da parede cardíaca (Bing et al., 2002). Se o estímulo hipertrófico persiste, as células cardíacas poderão sofrer alterações patológicas que levam à insuficiência o que torna a hipertrofia um importante fator de morbidade e mortalidade (Mosterd, et al., 2001).

Entretanto, nem sempre os processos de ajuste que caracterizam a hipertrofia cardíaca estão associados à redução da função ou prejuízo bioquímico e/ou estrutural. De fato, a produção de espécies ativas de oxigênio (EAO), por exemplo, parece estar presente no processo de hipertrofia cardíaca seja ela fisiológica ou patológica. Na hipertrofia fisiológica causada pelo exercício, apesar de haver aumento da produção de espécies ativas de oxigênio (EAO), também ocorre aumento das defesas antioxidantes (Bertagnolli et al., 2006).

De fato, o aumento da produção de EAO está associado com diferentes processos envolvidos com o remodelamento cardíaco, inclusive na hipertensão (González, Fortuño et al., 2003), sendo um dos possíveis mecanismos para o desenvolvimento da hipertrofia nesta patologia. Esta observação é reforçada com o achado de que a utilização de antioxidantes que são capazes de prevenir (Araujo, et al., 2007) ou até inibir (Nakamura, et al., 1998) a hipertrofia patológica. Tais resultados indicam a participação importante do estresse oxidativo nos mecanismos hipertróficos de ajuste ao processo hipertensivo.

Na hipertensão arterial sistêmica a produção de EAO e o desequilíbrio redox causam um aumento do estresse oxidativo (Touyz, 2004). Os animais SHR, além de

apresentarem a pressão arterial aumentada, possuem um aumento na concentração de Ang II tecidual cardíaca (Filho et al., 2008) que pode induzir a reprogramação gênica que leva ao aumento da expressão de fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular no coração (Dostal et al., 2000). Frank e colaboradores (2000) mostraram que a Ang II ativa a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase que, por sua vez aumenta a produção de ânion superóxido e, conseqüentemente, estimula o estresse oxidativo. Além disso, estudos em corações hipertróficos mostram a presença significativa de NADPH oxidase nos cardiomiócitos (Li, et al., 2002; Mohazzab-H). Dessa forma, na hipertensão, além da pressão arterial aumentada, a associação entre o aumento da Ang II tecidual, da atividade da NADPH oxidase, da produção de ânion superóxido, do estresse oxidativo e o desbalanço simpátovagal parecem ser elementos importantes na indução do quadro patológico de hipertrofia cardíaca.

1.5 Controle Autônômico e Hipertensão

Já está estabelecido na literatura que também a modulação autonômica do sistema cardiovascular pode estar alterada de forma diversa pelos medicamentos anti-hipertensivos e isso pode interferir no prognóstico dos pacientes hipertensos. O sistema nervoso simpático (SNS), por exemplo, sofre influência da Angiotensina II que, quando ligada ao seu receptor AT1, facilita a liberação de neurotransmissores nos terminais nervosos simpáticos no coração (Zimmerman et al., 1981; Rump et al., 1994). Dessa forma, alguns estudos têm buscado avaliar tanto os efeitos dos iECA como dos ARA sobre o tônus simpático, predominante no quadro de hipertensão arterial sistêmica. No entanto, os efeitos modulatórios do sistema autonômico em resposta a esses agentes ainda são contraditórios, embora dependentes da dose e duração do tratamento (De

Champlain et al., 1994 ; Giattanasio et al., 1992; Pancera, et al., 1999; Rongen et al., 1998 ; Franchi et al., 2002).

Em um estudo feito com pacientes hipertensos tratados com trandolapril, um iECA, De Champlain e colaboradores (1994) verificaram que o tratamento não alterou a frequência cardíaca nem as concentrações plasmáticas de noradrenalina. Além disso, Pancera e colaboradores (1999) encontraram uma redução significativa na modulação simpática após a administração de losartan em indivíduos hipertensos. Por outro lado, Rogen e colegas (1998) não encontraram nenhuma diferença no tônus simpático com a administração do mesmo fármaco em humanos. Tais diferenças provavelmente se devam à diferenças metodológicas, tais como população alvo do estudo, período de tratamento, entre outros.

1.6 Avaliação do controle autonômico: modulação da FC e PA

A variabilidade natural dos parâmetros cardiovasculares reflete uma interação de diversos fatores que, em sua maioria, envolvem a influência do sistema nervoso autônomo sobre o funcionamento cardiovascular, como o estresse ambiental, mudanças de postura e efeito mecânico da respiração (Reis et al., 1997; Montano et al., 2008).

As alterações no balanço simpatovagal, produzem variações na frequência cardíaca em situações patológicas (Farah et al., 2007; Moraes et al., 2000) e fisiológicas (Malliani et al., 1991; Montano et al.; 1994). Tais variações são obtidas através da ação dos sistemas simpático e parassimpático que interagem rapidamente, modulando a FC e a PA de forma diferenciada (Malliani et al., 1991).

Considerando que existe um desbalanço simpatovagal em muitas situações patológicas, a análise do controle autonômico pode fornecer informações importantes de caráter diagnóstico, mas principalmente de caráter prognóstico podendo ser utilizado

como um indicador do grau de comprometimento do controle cardiovascular (Malliani e Montano, 2002). Nesse sentido, o uso de uma técnica não invasiva, capaz de obter o máximo de informações a respeito desse sistema é de extrema importância no diagnóstico das doenças cardíacas principalmente em humanos (Montano, 1994).

A avaliação da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da pressão arterial sistólica (VPAS) fornece informações importantes a respeito do controle autonômico, pois expressa quantitativamente o balanço simpátovagal sobre o sistema cardiovascular. Quanto menor a VFC, maiores serão os riscos de doenças cardíacas (Reis et al., 1997). A diminuição da VFC constitui um importante fator prognóstico para o aparecimento de eventos cardíacos tanto em indivíduos previamente saudáveis quanto em portadores de cardiopatias (Cerutti et al., 1994; Mainardi et al., 1995; Parati et al., 1995; Goldberger et al., 2001; Iwasaki et al., 2003; Ribeiro et al., 2001). Estes resultados são confirmados em pacientes pós-infarto do miocárdio, por exemplo, quando foi observada uma redução na VFC, considerada um fator de risco independente para eventos arrítmicos e mortalidade global (Reis et al., 1997).

Por outro lado, a variabilidade da pressão arterial (VPA), embora possa mudar em diferentes condições comportamentais, pode estar aumentada nas mais diversas condições patológicas. Quanto maiores os valores de pressão arterial ou quanto maior a idade do paciente, maior será a VPA (Mancia et al., 2000).

Dessa forma, a análise no domínio da frequência, ou análise espectral, é uma metodologia de grande aplicação clínica e potencialidade, por usar em grande parte registros não invasivos e fornecer uma avaliação quantitativa da função cardiovascular (Malliani et al., 1991; Stauss, 2007; Montano et al., 2008). A análise espectral de séries temporais de frequência cardíaca, ou tacograma, e de pressão arterial sistólica, ou

sistograma, permite não apenas a avaliação da variabilidade como também a sua caracterização em componentes freqüenciais específicas. As oscilações rítmicas de pressão e freqüência cardíaca apresentam três faixas distintas: a faixa HF (*High Frequency*), similar à atividade respiratória normal; a LF (*Low Frequency*) e a VLF (*Very Low Frequency*). Tais oscilações variam em amplitude e freqüência de acordo com o comportamento, condições fisiológicas e patológicas (Malliani et al., 1991; Pecis et al., 2000; Montano et al, 2008). Além disso, tais componentes de freqüência da variabilidade da pressão arterial estão associadas a diferentes modulações, tanto do sistema nervoso simpático quanto da função vascular miogênica, do óxido nítrico derivado do endotélio e até mesmo da modulação do sistema renina angiotensina sobre a pressão arterial (Stauss, 2007).

As componentes LF e HF da VFC e da VPAS estão relacionadas às modulações simpática e vagal, respectivamente. Entretanto, por serem obtidas de forma indireta, diferentemente das medidas de tônus simpático e vagal, as alterações sobre tais componentes de freqüência não estão sempre diretamente ligadas ao aumento ou redução da atividade simpática e/ou vagal. A avaliação da variabilidade da freqüência cardíaca, por caracterizar resposta à ação do sistema nervoso sobre o coração, permite avaliar o controle autonômico através da relação entre as componentes espectrais LF/HF, ou seja, a relação entre as modulações simpática e vagal sobre o ritmo cardíaco. Por outro lado, a avaliação da variabilidade da pressão arterial sistólica relaciona-se diretamente à ação autonômica sobre o sistema vascular. Dessa forma, a componente LF obtida através da análise espectral do sistograma fornece informações quantitativas sobre a modulação simpática sobre o tônus vascular (Malliani et al., 1991). Sabemos que em animais há uma associação entre o SRA e a faixa de freqüências VLF. De fato, estudos em ratos demonstraram que a potência da faixa VLF da variabilidade da pressão arterial

aumenta se o SRA é estimulado e este aumento pode ser bloqueado pelos ARA (Ponchon et al., 1993; Ponchon e Elghozi, 1996; Blanc et al., 2000). Estes estudos apontam para o fato de que, em animais, há uma relação entre o componente VLF e o SRA. No entanto, esta relação não está estabelecida em humanos (Stauss, 2007) e portanto aumenta a necessidade de maiores estudos para determinar a real possibilidade de usar no futuro ferramentas não invasivas, e portanto seguras como método de diagnóstico para seres humanos, que identifiquem a participação do SRA em qualquer condição fisiopatológica.

Neste sentido, métodos não lineares também vêm sendo amplamente aplicados para analisar sinais biológicos (Porta et al., 2001; Moraes et al., 2000; Makikallio et al., 1999) seja por permitirem a visualização de alterações antes imperceptíveis com o uso de métodos tradicionais, especialmente em situações com redução acentuada da variabilidade, como também devido ao fato da maioria destes métodos não lineares não possuir as exigências limitativas de métodos lineares, como, por exemplo, a estacionariedade do sinal. Tais exigências são freqüentemente violadas em casos de alterações rápidas e não repetitivas como em situações que precedem eventos cardíacos e arritmias.

Uma ferramenta não linear que vem ganhando importância na análise de sinais biológicos é a análise de irreversibilidade (Porta et al., 2008; Dicks et al., 1995; Van Der Heyden et al., 1996). A irreversibilidade estatística é uma propriedade fundamental que permite detectar não-linearidades e avaliar o estado de equilíbrio/desequilíbrio de um sistema dinâmico. Estudos aplicados a séries temporais de FC têm apontado uma alteração no percentual de irreversibilidade em condições caracterizadas por predominância simpática tanto fisiológicas (Porta et al., 2008) como patológicas (Costa et al., 2005). Costa e colaboradores (2005) aplicaram um método de análise bidimensional

simples e mostraram que pacientes com insuficiência cardíaca apresentam uma redução do percentual de irreversibilidade em baixas dimensões e atribuem a perda de padrões não lineares a estados patológicos.

Entretanto, uma análise bidimensional simples permite apenas a avaliação de mecanismos que agem rapidamente em batimentos consecutivos. Sabe-se que alguns sistemas fisiológicos possuem ação mais lenta, com respostas atrasadas em alguns batimentos. Dessa forma, tais análises podem não ser suficientes para concluir sobre a redução de padrões não lineares, uma vez que, em situações patológicas, a resposta à ação de dinâmicas não lineares pode estar presente com um atraso temporal maior.

Dessa forma, uma expansão da análise bidimensional permitiria caracterizar alterações no estado de equilíbrio/desequilíbrio de um sistema dinâmico, considerando mecanismos que agem com diferentes atrasos temporais, e fornecendo uma nova visão dos mecanismos envolvidos no controle cardiovascular.

Sendo assim, este estudo visa estabelecer se existe uma associação entre a participação do SRA, através da administração de iECA, o controle autonômico da PA e FC, a hipertrofia cardíaca e o estresse oxidativo cardíaco. O estudo dos componentes LF, HF e VLF e suas associações com o SNA, SRA e o estresse oxidativo pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias que num futuro próximo poderão não apenas permitir um melhor manejo do tratamento, mas principalmente na prevenção das lesões associadas ao desenvolvimento e estabelecimento da hipertensão arterial sistêmica.

Neste sentido, estudos têm demonstrado uma forte associação entre SRA, SNS e estresse oxidativo (Bertagnoli et al., 2008) salientando a importância de reduzir a participação tanto do SRA quanto do SNS para tratar adequadamente a hipertensão arterial sistêmica, seja através de intervenções farmacológicas ou não. Alguns estudos

mostram que os efeitos benéficos na intervenção sobre o SRA podem ser independentes da redução da PA (Chevalier, 1994; Baker, 1994) indicando que a ação dos fármacos sobre os mecanismos locais pode influenciar o estresse oxidativo no coração e conseqüentemente a hipertrofia cardíaca, sendo essas as alterações primordiais ou imprescindíveis para a melhora cardiovascular na hipertensão em ratos SHR.

2. HIPÓTESE

H₁ : A inibição da enzima conversora da angiotensina em ratos espontaneamente hipertensos, em fase de hipertensão arterial sistêmica sustentada, é capaz de reduzir a hipertrofia, o estresse oxidativo e melhorar o controle autonômico mesmo sem reduzir a pressão arterial.

H₂ : Na hipertensão arterial sistêmica, existem mecanismos não lineares associados à ativação simpática crônica, cujo tratamento com um inibidor da enzima conversora da angiotensina, por intervir sobre essa ativação, é capaz de restaurar a padrões similares à situação controle.

3. OBJETIVOS

- Geral:

Avaliar o efeito do bloqueio do SRA sobre o estresse oxidativo e o controle autonômico da FC e da PA e modulação autonômica vascular.

- Específicos:

Avaliar o efeito da inibição parcial da enzima conversora de angiotensina sobre:

- a) padrões não lineares relacionados à ativação simpática
- b) a hipertrofia cardíaca
- c) o perfil oxidativo cardíaco
- d) a variabilidade da frequência cardíaca e o balanço autonômico;
- e) o SRA sistêmico através da componente VLF;
- f) a variabilidade da pressão arterial sistólica e a sua componente LF;
- g) a sensibilidade baroreflexa.

4. MÉTODOS

4.1. Animais

Todos os procedimentos experimentais adotados obedeceram às normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e da Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS (Goldin & Raymundo, 1997). Os experimentos foram iniciados após submissão e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Foram utilizados ratos machos Wistar-Kyoto e espontaneamente hipertensos (SHR), com 15 semanas de idade e pesando entre 250 e 300 gramas, provenientes do Biotério da Universidade de São Paulo. O biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul foi responsável pela manutenção de todos os animais envolvidos neste experimento. Os animais foram mantidos em caixas individuais, em ambiente com temperatura (22 a 24°C) e luz controlada em ciclo claro-escuro de 12 horas (07h00min-19h00min, período claro). Todos os animais receberam ração e água de modo irrestrito e passaram por um período de adaptação de 2 semanas antes do início do protocolo.

A divisão dos grupos e o tamanho das amostras utilizadas, estão descritos nos artigos referentes a cada estudo.

4.2. Tratamento com iECA

Para o estudo com doses não-hipotensora e hipotensora os animais foram submetidos ao tratamento com Enalapril, um inibidor da enzima conversora da angiotensina, com doses diárias de 0,1 ou 10 mg/kg, respectivamente. A dose baixa de 0,1 mg/Kg foi estabelecida por já haver demonstrado ser capaz de alterar parâmetros

morfométricos, como a hipertrofia, sem alterar os valores de pressão arterial sistólica (Raasch et al., 2002). A administração foi feita através de gavagem intragástrica, uma vez por dia, durante 10 semanas. A dose foi ajustada semanalmente de acordo com o peso dos animais.

4.3. Procedimento cirúrgico

As avaliações hemodinâmicas foram realizadas através da análise de medidas diretas de pressão arterial a partir da canulação da artéria femoral. O procedimento experimental utilizado para cateterismo segue o descrito no trabalho de Waynforth e Flecknell (1992). Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (90 mg/kg) e Cloridrato de Xylasina (20 mg/kg), de forma intra-peritoneal, que corresponde à recomendada pelo Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1985). Durante a cirurgia, os animais foram colocados sobre uma mesa cirúrgica e mantidos aquecidos por luz através de uma lâmpada colocada a 15 cm do animal. Os cateteres, confeccionados em tubos tygon PE-50/PE-10 (Clay Adams, USA), foram preenchidos com soro fisiológico 0,9% e heparina sódica (Liquelme-Roche, 5000U), na proporção de 0,5 mL para 0,02 mL, respectivamente. Na cirurgia, por uma incisão na região inguinal, a extremidade do cateter foi introduzida na artéria femoral para posterior registro de pressão arterial. Os catéteres de polietileno (P50) foram exteriorizados na região dorsal do pescoço e foram mantidos desobstruídos usando-se uma solução de 0,01 ml de heparina sódica (Liquemine – Roche, 5.000 U) diluída em 1 ml de solução fisiológica de NaCl 0,9%, durante a lavagem que precedia cada registro de pressão. Após esses procedimentos, os animais eram colocados em gaiolas individuais, aquecidos e receberam água e alimentos *ad libitum*.

4.4. Registro da Pressão Arterial

A medição direta e contínua da pressão arterial foi feita após 24 horas do procedimento de cateterismo. Durante o registro, os animais permaneciam acordados e com livre movimentação na própria gaiola. A cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm, que permite livre movimentação do animal pela caixa durante todo o período do experimento. Para registrar as modificações na pressão arterial, a extensão estava conectada a um transdutor de sinal (modelo 041-500503A – CDX III Transducer With Male/Male Linden Fittings; Argon, Athens, TX, EUA), calibrado e conectado a um amplificador de sinais General Purpose, Stemtech, Wood Dale, IL, USA. O sinal amplificado foi digitalizado pelo sistema Windaq/DATAQ. Os sinais de pressão arterial foram adquiridos a uma frequência de amostragem de 2000 Hz por canal durante 30 minutos contínuos.

4.5. Construção das séries temporais

As séries temporais de intervalos RR (tacogramas) e de pressão arterial sistólica (sistogramas) foram obtidas a partir dos registros de pressão arterial. De tais séries foram selecionados trechos estacionários de aproximadamente 300 batimentos, coincidentes no sistograma e tacograma. Tais trechos foram utilizados nas subseqüentes análises.

4.6. Avaliação do controle autonômico – Análise espectral

A análise espectral dos sinais captados foi realizada utilizando os softwares próprios para este tipo de análise (Casali e Casali, 2007), que permitem executar o processamento preliminar dos sinais registrados e avaliar todos os parâmetros necessários obtidos pelo modelo auto-regressivo (AR).

Os espectros das séries temporais de tacograma e sistograma, referentes a cada trecho selecionado, foram avaliados quantitativamente considerando os valores de variabilidade da FC e PAS, potência absoluta da componente LF da VPAS (relativa à modulação simpática) e a relação entre as potências das componentes LF/HF da VFC (balanço simpatovagal). Também a potência absoluta da componente VLF da VPAS foi considerada por corresponder à modulação do SRA sobre a PAS.

As faixas de frequência relativas aos sinais de variabilidade de ratos são: VLF (0-0,20Hz), LF (0,20-0,75Hz) e HF (0,75-3,00Hz).

4.7. Avaliação do controle autonômico – Análise bidimensional de irreversibilidade temporal

A irreversibilidade estatística é uma propriedade fundamental que permite detectar não-linearidades e avaliar o estado de desequilíbrio de um sistema dinâmico. Um sinal é dito reversível se as suas propriedades estatísticas são invariantes com a inversão no tempo. A análise bidimensional múltipla permite avaliar a irreversibilidade temporal em baixas dimensões, ou seja, considerando dinâmicas que agem sob batimentos consecutivos e, em altas dimensões que considera dinâmicas com atrasos temporais (Casali et al., 2008).

Existem na literatura muitos métodos para detecção de irreversibilidade baseados na avaliação de assimetrias em $L=2$, ou seja, na distribuição dos dados no plano $(x(i), x(i+1))$ com respeito à linha diagonal média (Porta et al., 2006.). Por definição, a assimetria é incompatível com a reversibilidade temporal.

O método bidimensional múltiplo avalia a irreversibilidade L -dimensional testando a assimetria de distribuições obtidas projetando a dinâmica L -dimensional em qualquer plano de referencia ortogonal. Para medir a assimetria, aplicamos o método de

skeewness às séries de primeiras variações, ou seja, das diferenças entre os pontos consecutivos. Para testar a significância estatística, utilizamos um conjunto de 500 surrogados (Schreiber e Schmitz, 2000), tendo como hipótese nula a suposição de que o sinal é gerado por um processo linear e, portanto, é reversível. A Figura 1 mostra um exemplo da análise bidimensional múltipla aplicada a séries de tacograma em situações de repouso e manobra de estimulação simpática (ortostatismo à 90 graus). É possível verificar a reversibilidade em $L=2$ nas duas situações e uma irreversibilidade presente em $L=3$, ou seja, uma dinâmica não linear agindo com um atraso temporal maior nesta situação.

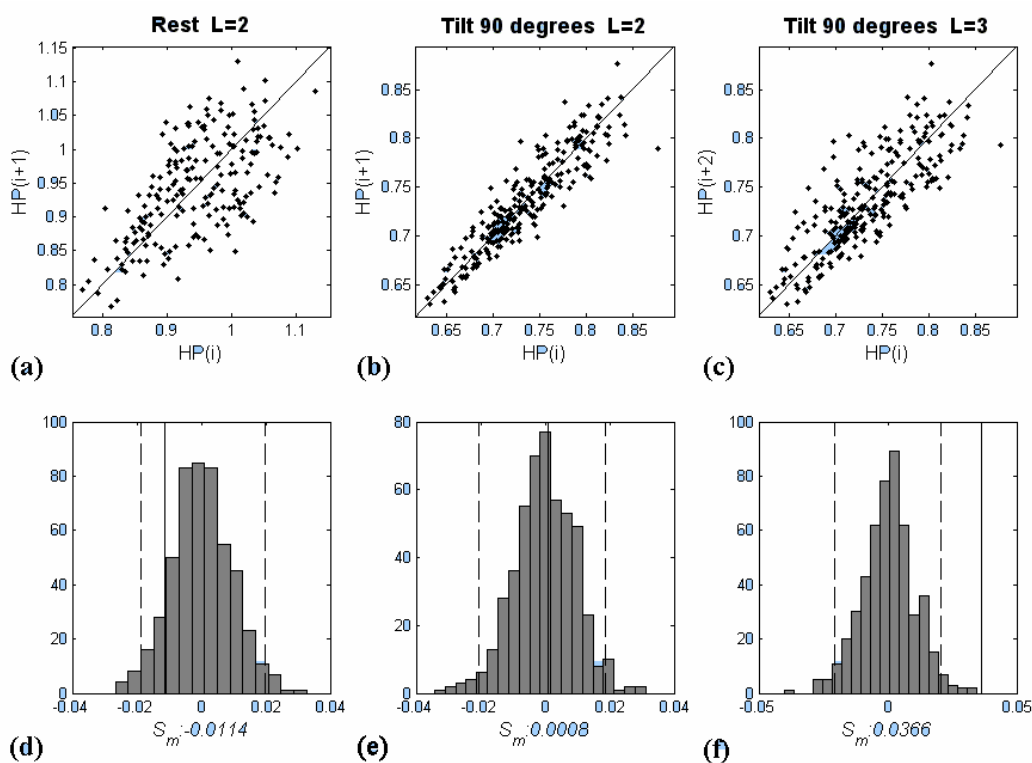


Figura 1 – Exemplos de análise de irreversibilidade utilizando o teste bidimensional múltiplo. As séries de tacograma foram obtidas em protocolo de estimulação simpática (ortostatismo a 90 graus) aplicada a humanos. Os painéis inferiores exibem a distribuição da assimetria de *skeewness* para os conjuntos de surrogados e o intervalo entre linhas tracejadas onde não se pode rejeitar a hipótese nula. A linha contínua mostra o valor da assimetria dos sinais nos correspondentes painéis superiores. Os sinais são reversíveis, em $L=2$, em repouso (0 graus) e em situação de estimulação (a,b). Entretanto, na situação com 90 graus, em $L=3$ (c), o tacograma é irreversível.

4.8. Estimativa da modulação do sistema renina angiotensina – Análise espectral

A técnica de análise espectral permite estimar a modulação do sistema renina angiotensina sobre a pressão arterial sistólica, em animais, através da quantificação da faixa VLF. Estudos com ratos demonstraram que a potência da faixa VLF da VPAS aumenta se o SRA é estimulado experimentalmente e diminui, se é bloqueado por um antagonista do receptor AT_1 (Ponchon et al., 1993; Ponchon e Elghozi, 1996). Tal avaliação será feita conforme descrito no item sobre a avaliação do controle autonômico pela análise espectral.

4.9. Avaliação da sensibilidade baroreflexa – Análise espectral

A sensibilidade baroreflexa espontânea foi avaliada através do coeficiente α . Tal índice, já bem estabelecido na literatura, corresponde à raiz quadrada da relação entre as componentes LF absolutas da VFC e VPA e é expresso em s/mmHg (Mancia et al., 1999; Baselli et al., 1994; Pagani et al., 1988; Fazan et al., 2005).

4.10. Medidas Morfométricas Cardíacas - Preparo do Tecido

Imediatamente após o registro da pressão arterial, os animais do experimento foram pesados e mortos por decapitação, de acordo com as normas descritas pelo “Animal Welfare Regulation”. O coração e a tíbia foram rapidamente retirados para pesagem e medição, respectivamente. A relação entre o peso do coração e peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal (índice de hipertrofia cardíaca) foi expressa em miligramas/gramas de peso corporal. Esta relação é aceita pela literatura como uma medida adequada de hipertrofia cardíaca no rato.

4.11. Medidas de Dano Oxidativo

O dano oxidativo aos lipídeos foi avaliado através da quimiluminescência iniciada pelo hidroperóxido de tert-butil em solução contendo homogeneizado cardíaco e avaliação da capacidade de resposta produzida pela amostra. A quimiluminescência foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Bromma, Sweden). O ensaio consiste em adicionar 3,5 mL de tampão (140 mmol/L de KCl, 20 mmol/L de fosfatos, pH 7,4) e 0,5 mL de homogeneizado para a realização da leitura basal. Adiciona-se ao meio de reação 30 μ L de t-BOOH (3 mmol/L) e realiza-se a segunda leitura (Gonzalez et al., 1991). O mesmo procedimento foi realizado para amostras de sangue heparinizadas e centrifugadas previamente.

O dano oxidativo às proteínas foi realizado utilizando o ensaio da determinação das carbonilas (Reznick e Packer, 1994). A técnica é baseada na reação das proteínas oxidadas do tecido com 2,4 dinitro fenil hidrazina (DNPH) em meio ácido. Após sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos, incuba-se o ensaio com guanidina. A absorvância das carbonilas foi medida em espectrofotômetro a 360 nm.

4.12. Medida da Atividade das Enzimas Antioxidantes

Para a determinação da superóxido dismutase (SOD), utilizou-se a técnica foi baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado (Marklund, Oreland et al., 1983). Para tanto, foram utilizados 15 μ l da amostra previamente preparada, tampão Tris-base, 8 μ l de

pirogalol (24 mmol/L) e 4 μ l de catalase (30 μ mol/L). A variação na absorbância foi acompanhada a 420 nm durante 2 minutos e os resultados expressos em U/mg de proteína.

A atividade da catalase (CAT) foi avaliada através do consumo de H₂O₂. O ensaio consiste em medir a diminuição da absorbância ao comprimento de onda de 240 nm. O ensaio é realizado utilizando uma solução tampão de fosfatos de sódio a 50 mmol/L em pH 7,4 e peróxido de hidrogênio 0,3 mol/L. Os resultados foram expressos em pmoles/mg de proteína (Aebi, 1984).

A atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPX) foi determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPX. Para tanto, adiciona-se 330 μ l de tampão de fosfatos 143 mmol/L e EDTA 1 mmol/L (pH 7,5), 500 μ l de NADPH (0,24 mmol/L), 10 μ L de azida sódica (1 mmol/L) para inibir a atividade da catalase, 50 μ l de GSH (5 mmol/L) e 10 μ L de glutaciona redutase 0,25 U/mL. Após, adiciona-se 50 μ l de hidroperóxido de tert-butila (0,5 mmol/L), e a diminuição da absorbância, devido ao consumo de NADPH, será monitorada por aproximadamente 5 minutos. A absorbância é registrada a 340 nm e os resultados são expressos em nmoles/min/mg de proteína (Flohé e Günzler, 1984).

A dosagem das proteínas foi realizada seguindo o método de Lowry e colegas (Lowry et al., 1951).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada a partir dos resultados obtidos, expressos como média \pm desvio padrão nos artigos. Para os dados que apresentaram distribuição normal através do teste de Kolmogorov, foram utilizados testes estatísticos paramétricos: teste t de Student para amostras não pareadas; ANOVA de uma via complementado pelo teste de Tukey; correlação de Pearson para realizarmos as associações entre os diferentes parâmetros obtidos. Para as variáveis cuja distribuição foi rejeitada no teste de normalidade de Kolmogorov, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis on Ranks. O Software utilizado para a realização da análise estatística foi o SigmaPlot, versão 11.0. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho estão descritos na forma de artigos para a submissão em revistas internacionais. O primeiro artigo descreve um método implementado para análise de series temporais e já está publicado em uma revista indexada e disponível na Internet. Os demais resultados estão divididos em outros dois artigos. A ordem de apresentação segue a seqüência lógica a seguir:

- 1) Método de análise de não linearidades associadas ao controle autonômico
- 2) Avaliação da relação entre sistema nervoso simpático e irreversibilidade em situações de ativação simpática fisiológica, patológica e após tratamento com iECA.
- 3) Efeito do tratamento com um iECA em dose não anti-hipertensora.

6.1. ARTIGO 1

Título: “Multiple testing strategy for the detection of temporal irreversibility in stationary time series.”

Status: Artigo aceito – Physical Review E 2008, 77:066204.

Objetivo: Propõe uma técnica nova para detecção de irreversibilidade em series temporais baseada em teste bidimensional múltiplo. Tal propriedade estatística permite detectar a presença de dinâmicas não lineares agindo em diferentes escalas temporais. O teste foi aplicado a séries de tacograma em situações de estimulação simpática.

Conclusão: O método, depois de validado através de sinais teóricos, demonstrou a importância da avaliação multidimensional em situações fisiológicas, sobretudo aquelas reguladas por mecanismos de retro-alimentação múltipla, como o caso da frequência cardíaca.

Multiple testing strategy for the detection of temporal irreversibility in stationary time series

Karina R. Casali,^{1,2,*} Adenauer G. Casali,² Nicola Montano,² Maria Claudia Irigoyen,¹ Fabricio Macagnan,³ Stefano Guzzetti,⁴ and Alberto Porta^{5,†}

¹Physiology Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Department of Clinical Sciences "L. Sacco," University of Milan, Milan, Italy

³Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁴Internal Medicine II, L. Sacco Hospital, Milan, Italy

⁵Department of Technologies for Health, Galeazzi Orthopaedic Institute, University of Milan, Milan, Italy

(Received 21 March 2007; revised manuscript received 20 November 2007; published 6 June 2008)

We propose a strategy for the detection of temporal irreversibility in stationary time series based on multiple bidimensional tests. The test is helpful to evaluate the displacement of irreversibility toward high dimensions. The test can be used independently of the theoretical functionals actually utilized to check irreversibility. The method was applied to simulated nonlinear signals generated by the delayed Henon map and a two-loop negative feedback model to show how the presence of a delay could produce the displacement of irreversibility toward higher dimensions. The method was applied also to series of a biological variable (i.e., heart period) that is known to be regulated by multiple feedback loops. Simulations and real data support the need of exploring progressively increasing embedding dimensions when assessing temporal irreversibility.

DOI: 10.1103/PhysRevE.77.066204

PACS number(s): 05.45.Tp, 05.70.Ln, 87.19.Hh

Among several aspects of a time series that can be quantified, time irreversibility has recently gained attention in biology and medicine [1,2]. This attention is simply the result of the ability of time irreversibility analysis to detect nonlinear dynamics [3,4], and indicates the existence of disequilibrium states [5], i.e., two fundamental properties of living dynamical systems.

In time series analysis, a signal is said to be reversible if its statistical properties are invariant with respect to time reversal, otherwise it is said to be irreversible. From this definition, reversible time series have the joint probability of $(x(i), x(i+1), \dots, x(i+L-1))$ indistinguishable from that of $(x(i+L-1), x(i+L-2), \dots, x(i))$, where L is the embedding dimension.

Usually time irreversibility tests have been devised in low-dimensional phase spaces, basically by comparing the distribution of points in the plane $(x(i), x(i+1))$ to that in the plane $(x(i+1), x(i))$ [6–10]. However, dynamics might be roughly reconstructed in a low-dimensional phase space because complex patterns cannot be completely unfolded, and, accordingly, low-dimensional irreversibility tests may lead to unreliable results especially when dealing with high-dimensional systems such as those including delays [11].

Few times irreversibility analysis has been carried out in a dimensional phase space $(x(i), x(i+1), \dots, x(i+L-1))$ with $L > 2$ and in these applications L has been fixed to arbitrary values (i.e., $L=4$ or 5) [2,4], thus preventing one from understanding the information that can be derived when L is progressively increased.

In the cardiovascular system, regulations are usually performed via multiple feedback loops incorporating different delays [12,13], thus leading to systems that can be high dimensional and might show time scales characterized by dif-

ferent dynamical properties including a different degree of time irreversibility. In this study we propose a multiple testing strategy for the detection of temporal irreversibility in time series. The test is helpful to evaluate the displacement of irreversibility toward high dimensions. The test can be used independently of the theoretical functional actually utilized to check irreversibility (among all present in literature [6–9], here we utilized the one proposed in [9]). The method was applied to simulated nonlinear signals generated by the delayed Henon map and a two-loop negative feedback model [14] to show how the presence of a delay could produce the displacement of irreversibility toward higher dimensions and to highlight the possibility of the coexistence of time scales with different degrees of irreversibility.

In terms of real data, we tested high-dimensional irreversibility in heart period (T) beat-to-beat series known to be regulated by nonlinear multiple delayed feedback loops (the most relevant over short time scales is baroreflex) [12,15,16] under experimental conditions altering the baroreflex delay [17,18] in the beat-to-beat domain.

I. IRREVERSIBILITY TEST

Given a stationary time series $x = \{x(i), i = 1, \dots, N\}$ and the series of vectors $x_L = \{x(i), x(i+\tau), \dots, x(i+(L-1)\tau)\}$, $i = 1, \dots, N - (L-1)\tau$, constructed using the technique of the delayed coordinates [19], x is said to be reversible if the probability distribution of x_L is not significantly different from that of $x'_L = \{x(i+(L-1)\tau), \dots, x(i+\tau), x(i)\}$, $i = 1, \dots, N - (L-1)\tau$, obtained after reversing time's arrow in each vector $x_L(i)$. This should hold for any L and any τ . In this work we used $\tau=1$ without any *a priori* assumption regarding the dimension L .

Most of the irreversibility tests [6–9] are devised for $L = 2$ [i.e., they consider points in the plane $(x(i), x(i+1))$]. The common feature of all tests is that the detection of irreversibility is based on the evaluation of asymmetry of the data

*rabellocasali@gmail.com

†alberto.porta@unimi.it

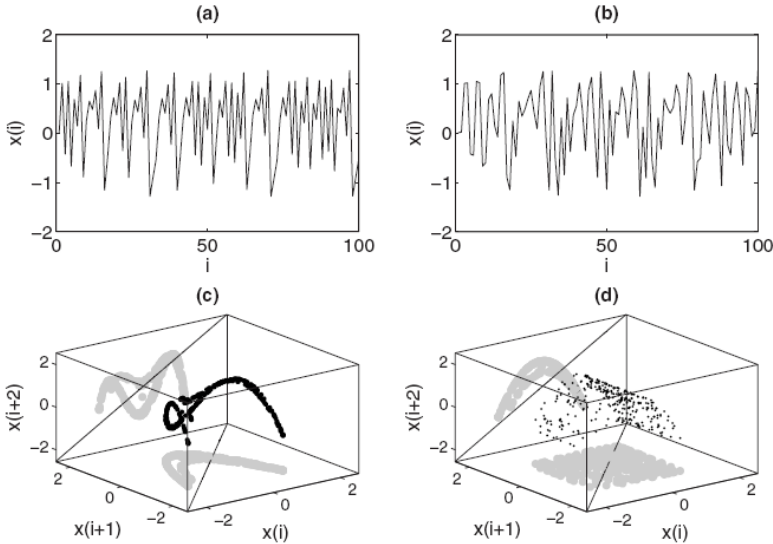


FIG. 1. Realizations of 100 samples of x computed from zeroth-order (a) and first-order (b) DHMs. Reconstruction of the dynamics of x derived from zeroth-order (c) and first-order DHMs (d) in the phase space $(x(i), x(i+1), x(i+2))$ (black circles). The projections of the dynamics onto the planes $(x(i), x(i+1))$ and $(x(i), x(i+2))$ are marked with gray circles. In the case of zeroth-order DHM projections onto the planes $(x(i), x(i+1))$ and $(x(i), x(i+2))$ are both asymmetric with respect to the main diagonal of the plane, while in the case of first-order DHM only the projection onto $(x(i), x(i+2))$ can reveal the asymmetry.

distribution in the plane $(x(i), x(i+1))$ with respect to the main diagonal line $x(i)=x(i+1)$ [7]. Indeed, by definition, this asymmetry is incompatible with time reversibility. Our study uses the correspondence between time irreversibility and asymmetry of the distribution to introduce a test of time irreversibility in stationary high-dimensional series.

Let us consider the plane $(x(i+m), x(i+n))$ with $m, n = 0, \dots, L-1$ and $m \neq n$ and denote with $d_{m,n}(i)$ the distance between the point $(x(i+m), x(i+n))$ and the main diagonal $x(i+m)=x(i+n)$ [i.e., $d_{m,n}(i)=k(x(i+n)-x(i+m))$, with $k=2^{(-1/2)}$]. Our test evaluates L -dimensional irreversibility by checking the asymmetry of the distribution of points obtained by projecting the L -dimensional reconstructed dynamics onto any orthogonal reference plane $(x(i+m), x(i+n))$, with $m, n=0, \dots, L-1$. This can be done by testing the asymmetry of the distribution of $d_{m,n}$ for any $n, m=0, \dots, L-1$ and $m \neq n$ with respect to 0. The obvious relationships $d_{m,n}(i)=-d_{n,m}(i)$ and $d_{m,n}(i)=d_{0,(n-m)}(i+m)$ for $n > m$ limit the number of tests to be performed in a stationary time series to $L-1$ (i.e., we need to test the asymmetry of the distribution of $d_{0,m}$ with $m=1, \dots, L-1$).

Any asymmetry measure can be applied to the $d_{0,m}$ distribution. In this study we used the skewness of $d_{0,m}$,

$$S_m = \frac{\sum_{i=1}^{N-m} d_{0,m}(i)^3}{\left(\sum_{i=1}^{N-m} d_{0,m}(i)^2\right)^{3/2}}, \quad (1)$$

with $m=1, \dots, L-1$ [9]. When S_m is significantly different from 0 for a specific m with $m \leq L-1$, the series is labeled as irreversible in the $(m+1)$ -dimensional phase space. If x is irreversible in the $(m+1)$ -dimensional phase space, it is said to be L irreversible for any $L > m$.

To check if S_m is significantly different from 0 we utilized a surrogate data approach [20]. The null hypothesis is that x is generated by a linear process being reversible at least up to the dimension L eventually distorted by a static nonlinear transformation that does not alter reversibility of x . Accord-

ingly, we generated a set of 500 amplitude-adjusted Fourier transform (AAFT) surrogates [20]. S_m was calculated over the surrogate data (S_m^s 's) and over the original series (S_m^o). If S_m^o was smaller than the critical value defining the most extreme 2.5% of S_m^s 's or larger than the critical value defining the most extreme 97.5% of S_m^s 's, the null hypothesis was rejected and the series was said to be $(m+1)$ irreversible and generally L irreversible for any $L > m$.

II. SIMULATED DATA: DELAYED HENON MAP

The first type of simulation is devoted to emphasizing the need for irreversibility testing for high-dimensional dynamics generated by models including delays. We used the delayed Henon map (DHM) to generate a set of time series. The σ -order DHM can be written as

$$x(i+1) = 1 - ax^2(i-\sigma) + y(i-\sigma), \quad (2)$$

$$y(i+1) = bx(i-\sigma), \quad (3)$$

with $a=1.4$, $b=0.3$, and $i=\sigma+1, \dots, N-1$. A nondelayed Henon map has $\sigma=0$ and produces x that is found to be two irreversible. When the data is generated from higher-order DHM, the bidimensional irreversibility test fails to detect irreversibility. Indeed, the effect of a delay in the DHM is to displace irreversibility to higher dimensions. In Fig. 1, we plot the reconstruction of the dynamics of x in the phase space $(x(i), x(i+1), x(i+2))$ for a zeroth-order and first-order DHM. In the case of the zeroth-order DHM, when the dynamics is projected onto the plane $(x(i), x(i+1))$, the points are asymmetric with respect to the main diagonal $x(i)=x(i+1)$ [Fig. 1(c)], thus indicating that x is two-irreversible. In the case of the first-order DHM, when the dynamics is projected onto the plane $(x(i), x(i+1))$, the points are symmetric with respect to $x(i)=x(i+1)$ [Fig. 1(d)], thus failing to detect irreversibility. Irreversibility can be detected only when evaluating the asymmetry of the projection of the dynamics onto the plane $(x(i), x(i+2))$ with respect to $x(i)=x(i+2)$.

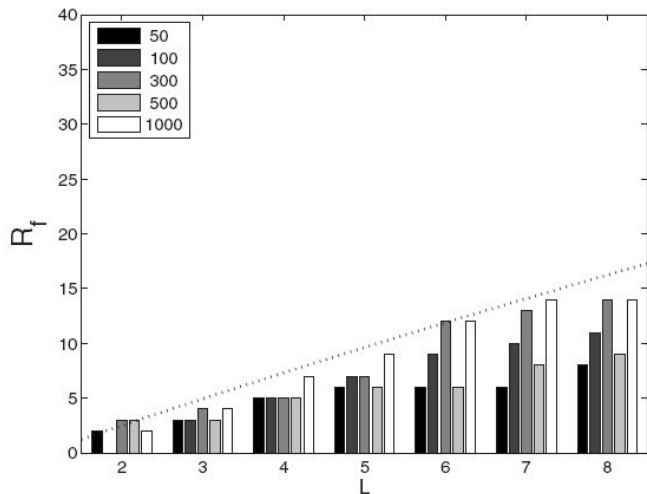


FIG. 2. Percentage of L -irreversible dynamics of the multidimensional irreversibility test relevant to 50, 100, 300, 500, and 1000 samples of WGN. Since WGN is reversible, the percentage of L -irreversible dynamics corresponds to the percentage of false rejections (R_f). The relationship $100 \times (1 - (1 - q_2)^{L-1})$, where q_2 is the probability of detecting two-irreversible dynamics is plotted as a dotted line.

III. SIMULATED DATA: WHITE GAUSSIAN AND COLORED NOISES

The second type of simulations was aimed at evaluating the percentage of false rejections (R_f) of the proposed irreversibility test. We generated 500 realizations of white Gaussian noise (WGN) of various lengths. WGN is known to be reversible [21], thus we should find $R_f=0$. In Fig. 2 we plot R_f in the case of WGN realizations with $N=50, 100, 300, 500,$ and 1000 as a function of L . It is worth noting that R_f is rather independent on N .

If q_{m+1} is the probability for a reversible signal to be detected as irreversible in the $(x(i), x(i+m))$ projection of the dynamics, the probability of a reversible signal to be found $(m+1)$ irreversible without rejecting the null hypothesis for lower dimensions is $q_{m+1} \prod_{k=2}^m (1 - q_k)$. Under the approximation that q_k is independent of the index k , i.e., $q_k = q_2 \forall k \in \{2, \dots, L\}$, we can estimate the R_f for an L -dimensional test as $1 - (1 - q_2)^{L-1}$. This relationship (multiplied by 100) is plotted in Fig. 2 (dotted line), showing that the estimated expression acts, indeed, as an upper bound to our data. Clearly, R_f increases as a function of L (i.e., it is more likely to have erroneous detection of L -irreversible dynamics when L is large). Hence, it is important to select a theoretical functional (here S) and/or to increase the level of confidence of the surrogate data test in order to have a small q_2 . In this study, with a confidence level of 95%, q_2 was about 2.5%. Therefore, in order to have $R_f \leq 10\%$, we limited L to 5, which is believed to be high for short heart rate variability data [22]. In general, the largest L that can be reliably explored can be derived by solving the equation $1 - (1 - q_2)^{L-1} = p$ after evaluating q_2 , where p is the probability of having a type I error in a multiple testing strategy. Usually p is set to 0.05.

We tested R_f over colored processes obtained by filtering WGN realizations with a transfer function with two complex

TABLE I. Percentage of true rejections of the multidimensional irreversibility test applied to first-order DHM (300 samples) corrupted with WGN of different standard deviations (i.e., 0%, 50%, 100%, and 150% of the standard deviation of the uncorrupted first-order DHM realization).

	$L=3$	$L=4$	$L=5$	$L=6$	$L=7$
0	100	100	100	100	100
50	100	100	100	100	100
100	86	87	87	89	90
150	58	61	62	63	65

and conjugated poles with modulus equal to 0.9 and phases equal to $\pm \pi/5$ or phases equal to $\pm 3\pi/5$, thus generating autoregressive processes. In the former case we simulated a process with a dominant slow oscillation, whereas in the latter case we simulated a process with a dominant fast oscillation (with a sampling frequency of 1 Hz, the pole frequency is 0.1 Hz or 0.3 Hz, i.e., the frequencies of the usual dominant oscillations present in heart rate variability). The course of R_f relevant to autoregressive process with slow dynamics was not significantly different from that derived from WGN (Fig. 2), while that relevant to the faster autoregressive dynamics had the same rate of increase as WGN but q_2 was 30% higher.

IV. SIMULATED DATA: DELAYED HENON MAP CORRUPTED BY NOISE

The third type of simulations aimed at evaluating the percentage of true rejections (R_t) of the proposed irreversibility test. We added WGN realizations to first-order DHM. The standard deviation of the WGN realizations was assigned as a percentage of the uncorrupted DHM dynamics (5%, 50%, 100%, or 150%). Results, reported in Table I, show that R_t is 100% provided that the standard deviation of the WGN is below 100%. Since irreversible dynamics are more likely to be detected at higher L , R_t increases in Table I as a function of L .

V. SIMULATED DATA: TWO-LOOP NEGATIVE FEEDBACK MODEL

The fourth type of simulation is devoted to emphasizing the need of an irreversibility test for high-dimensional dynamics generated by models producing different dominant time scales via multiple delayed feedback loops. Let us consider the two-loop negative feedback model [14] described by the delayed differential equation

$$\dot{P}(t) = -P(t) + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^2 \frac{\theta_i^n}{\theta_i^n + P^n(t - \tau_i)}. \quad (4)$$

We set $n=45$, $\theta_1=0.634$, and $\theta_2=0.704$, with delays $\tau_1=0.26$ and $\tau_2=2.00$ and integration step of 0.001, thus generating a quasiperiodic dynamics [14]. The series was downsampled with a downsampling factor of 50 and sequences of

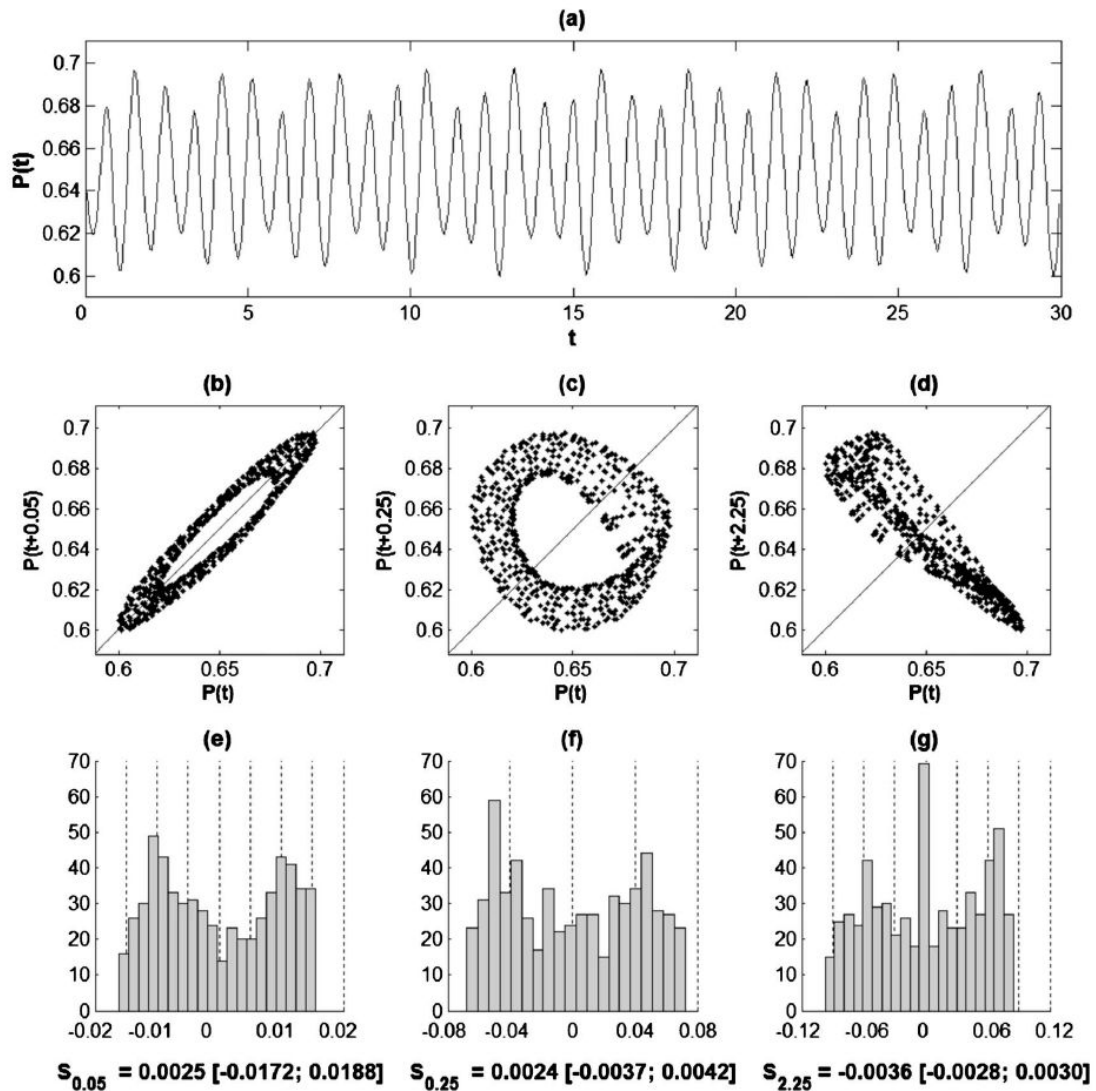


FIG. 3. Quasiperiodic dynamics obtained from the two-loop delayed feedback model (a). Scattergrams of $P(t+0.05)$ vs $P(t)$ (b), $P(t+0.25)$ vs $P(t)$ (c), $P(t+2.25)$ vs $P(t)$ (d); distributions of $P(t+0.05)-P(t)$ (e), $P(t+0.25)-P(t)$ (f), and $P(t+2.25)-P(t)$ (g) with their skewness and the interval of skewness derived from surrogates.

about 600 samples were considered. This signal exhibits two clearly different temporal scales [see Fig. 3(a)]: the faster with a period of about 0.9, while the slower is exhibited with a period more than three times larger.

Figure 3 shows the scattergrams in the planes $(P(t), P(t+0.05))$, $(P(t), P(t+0.25))$, and $(P(t), P(t+2.25))$. The distributions of $P(t+0.05)-P(t)$ and $P(t+0.25)-P(t)$ are symmetric [Figs. 3(e) and 3(f)], while that of $P(t+2.25)-P(t)$ is asymmetric [Fig. 3(g)]. This simulation suggests that, given a model showing two dominant time scales (one faster and one slower), these two time scales might show different degrees of reversibility. Indeed, the distribution of $P(t+\delta_i)-P(t)$ is asymmetric only when δ_i ranges between 2.20 and 2.40, thus linking irreversibility to the slower time scale. On the contrary, the faster time scale, which needs a time shift δ_i much smaller to be correctly resolved, is not detected as irreversible.

VI. HEART PERIOD VARIABILITY DATA

We applied the proposed irreversibility test to the heart period (T) beat-to-beat series (200–300 cardiac beats) derived from 26 young healthy humans undergoing to two different protocols. Ten subjects (ages ranging from 24 to 32) underwent recordings at rest and during 80° head-up tilt. Sixteen subjects (ages ranging from 21 to 35) underwent recordings at rest and standing. ECG (lead II) was sampled at 300 Hz (12-bit precision). T was derived as the temporal distance between two consecutive R peaks of ECG signal. Stationarity of the series was tested as reported in [23].

Figure 4 shows an example of the T irreversibility analyses for series taken from a subject during tilt and standing. T series during tilt has a skewness index ($S_1=0.0368$) out of the 500 surrogate interval $[-0.0164; 0.0137]$ being two irreversible. Indeed, the distribution of $T(i+1)-T(i)$ is asymmetric with respect to 0 [Fig. 4(d)]. On the contrary, the null

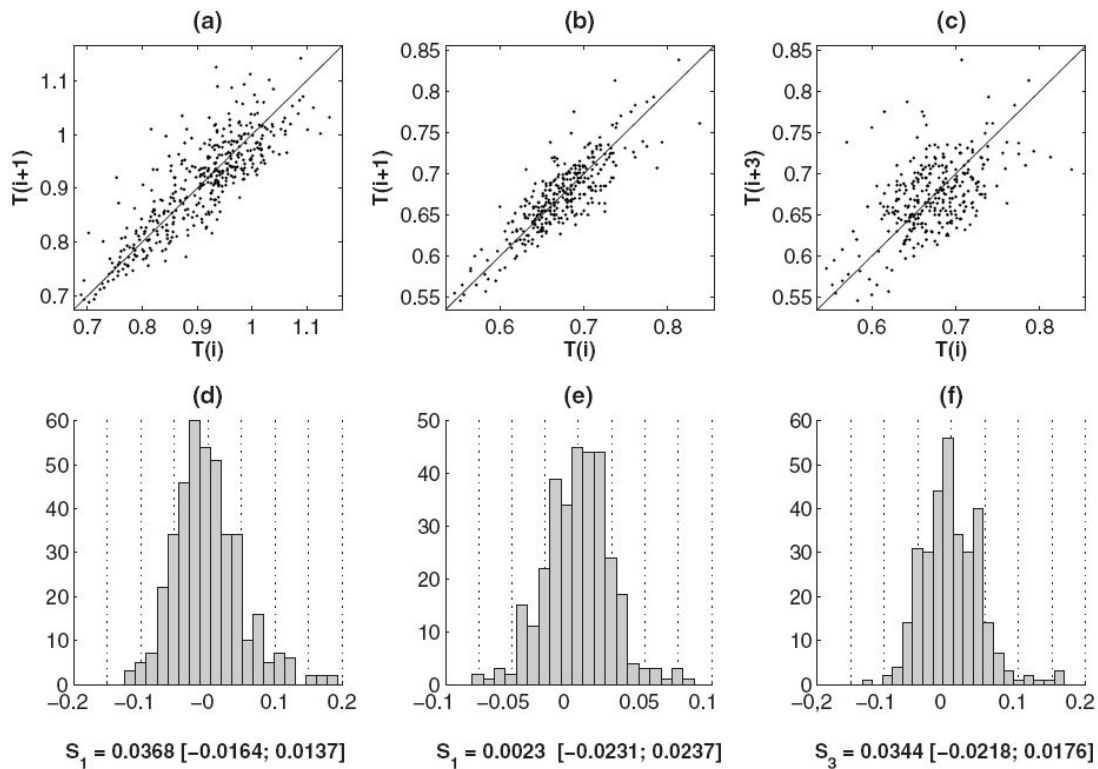


FIG. 4. Scattergrams of $T(i+1)$ vs $T(i)$ during tilt (a), $T(i+1)$ vs $T(i)$ during standing (b), and $T(i+3)$ vs $T(i)$ (c) during standing; distributions of $T(i+1)-T(i)$ during tilt (d), $T(i+1)-T(i)$ during standing (e), $T(i+3)-T(i)$ during standing (f) with their skewness and the interval of skewness derived from surrogates.

hypothesis of reversibility in the plane $(T(i), T(i+1))$ cannot be rejected in the case of the T series during standing. Indeed, the distribution of $T(i+1)-T(i)$ is symmetric with respect to 0 [Fig. 4(e)] with $S_1=0.0023 \in [-0.0231; 0.0237]$. The same series is found irreversible in the plane $(T(i), T(i+3))$ ($S_3=0.0344 \notin [-0.0218; 0.0176]$), thus being four irreversible. Indeed, distribution of $T(i+3)-T(i)$ is asymmetric with respect to 0 [Fig. 4(f)].

Figure 5 shows the percentages of L -irreversible T series in each experimental condition. The bars indicate the percentage of L -irreversible dynamics with $L=5$ (the solid part of the bars represents the percentage of L -irreversible dynamics with $L=2$). The percentage of two-irreversible dynamics during rest was similar to that during standing, while it increased during tilt. On the contrary, during standing the percentage of five-irreversible T series increased with respect to rest and became similar to that during tilt.

VII. DISCUSSION

Simulations relevant to the delayed Henon map and the two-loop negative feedback clearly demonstrated that irreversibility analysis cannot be carried out at arbitrary fixed and/or low L . Indeed, the presence of a delay in the underlying generation mechanism might produce a displacement of irreversibility toward higher phase space dimensions. In other words, reversible temporal scales might coexist with irreversible temporal scales that need higher-dimensional phase spaces to be completely unfolded and only the explo-

ration of progressively increasing L guarantees the correct evaluation of this dynamical property. In addition, simulations relevant to reversible processes (i.e., WGN or colored noises) indicated that the percentage of false rejections increases with L (i.e., it is more likely to erroneously detect irreversible dynamics at large L). Therefore, it is mandatory to adopt theoretical functionals that keep low the probability of false rejections and/or to increase the level of confidence of the surrogate data test. Simulations relevant to nonlinear delayed dynamics corrupted by reversible noise (i.e., WGN) suggested that the proposed test is quite robust with respect to noise.

The short-term analysis of T variability indicated that the T series is irreversible with $L=2$ in 25% and 27% of subjects at rest and during standing, respectively [7,24].

The increase of irreversible dynamics when passing from $L=2$ to $L=5$ is important both at rest and during standing, thus rendering mandatory the use of an irreversibility test that explores progressively increasing embedding dimensions. It is worth noting that the increase of irreversible dynamics when passing from $L=2$ to $L=5$ is more important during standing. This phenomenon might be related to the increased phase shift in the closed-loop baroreflex regulation observed during this experimental condition. Indeed, during standing the phase between the T and arterial pressure becomes more negative at the respiratory rate [25], thus indicating that the beat-to-beat interactions along the baroreflex loop do not occur in the same cardiac beat as at rest but with a delay of one or more beats. The increase of the delay in the beat-to-beat domain between T and arterial pressure has been

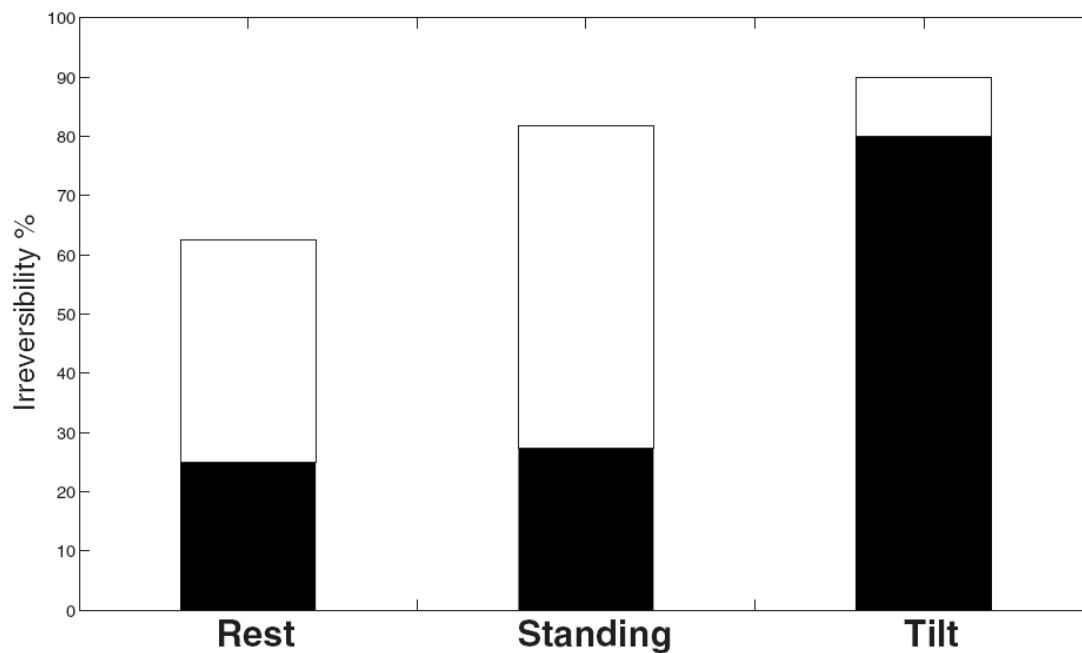


FIG. 5. Bar graph representing the percentage of five-irreversible dynamics relevant to the analysis of T series at rest, during standing and tilt. The solid bars indicate the percentage of two-irreversible dynamics.

observed in several experimental conditions characterized by sympathetic activation such as during lower body negative pressure [17], thus supporting the need to look at higher phase space dimensions during these conditions. Tilt is another experimental condition characterized by a sympathetic activation. Since T variability exhibits an important percentage of L -irreversible dynamics with $L=2$ [7,24], the increase of this percentage as a function of L is not very important. The larger presence of L -irreversible dynamics with $L=2$ during tilt than during the sympathetic activation produced by standing might be due to the larger importance of the sympathetic activation during tilt that reduces the complexity of T variability [26] and renders irrelevant the exploration of higher-dimensional phase spaces. Indeed, during tilt power spectrum exhibits only a dominant peak in the low-frequency band [27], while during standing the power spectrum of heart period variability is characterized by two clear peaks, in the low- (from 0.04 to 0.15 Hz) and high-frequency (around the respiratory rate) bands [28].

In conclusion, we tested the hypothesis that, in the presence of a signal characterized by at least two dominant time scales (e.g., quasiperiodic dynamics generated by a two-loop negative feedback or short-term heart rate variability), temporal scales characterized by different degrees of irreversibility might coexist. In the presence of an increased delay in the underlying closed-loop regulatory mechanisms and of complex dynamics characterized by several (more than two) dominant temporal scales, it is advisable to test irreversibility by exploring progressively increasing embedding dimensions since irreversibility might be shifted toward slower time scales.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge support from the CAPES/Brazil, FIRST 2005 grant, University of Milan, and Italian Space Agency DCMC Project.

-
- [1] C. Diks *et al.*, Phys. Lett. A **201**, 221 (1995).
 - [2] M. J. van der Heyden, Phys. Lett. A **216**, 283 (1996).
 - [3] T. Schreiber and A. Schmitz, Physica D **142**, 346 (2000).
 - [4] B. P. T. Hoekstra *et al.*, Chaos **7**, 430 (1997).
 - [5] I. Prigogine and I. Antoniou, Ann. N. Y. Acad. Sci. **879**, 8 (1999).
 - [6] M. Costa, A. L. Goldberger, and C.-K. Peng, Phys. Rev. Lett. **95**, 198102 (2005).
 - [7] A. Porta *et al.*, Comput. Cardiol. **33**, 77 (2006).
 - [8] P. Guzik *et al.*, Biomed. Tech. **51**, 272 (2006).
 - [9] C. L. Ehlers *et al.*, J. Neurosci. **18**, 7474 (1998).
 - [10] C. Braun *et al.*, Am. J. Physiol. **275**, H1577 (1998).
 - [11] M. C. Mackey and L. Glass, Science **197**, 287 (1977).
 - [12] H. P. Koepchen, in *History of Studies and Concepts of Blood Pressure Waves*, edited by K. Niyakawa, C. Polosa, and H. P. Koepchen (Springer, Berlin, 1984), pp. 3–23.
 - [13] D. Hoyer *et al.*, Chaos **17**, 015110 (2007).
 - [14] J. C. Bastos de Figueiredo, L. Diambra, L. Glass, and C. P. Malta, Phys. Rev. E **65**, 051905 (2002).
 - [15] G. Nollo *et al.*, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **283**, H1200 (2002).
 - [16] C. Borst *et al.*, J. Auton. Nerv. Syst. **9**, 399 (1983).

- [17] A. P. Blaber *et al.*, *Am. J. Physiol.* **268**, H1688 (1995).
[18] W. H. Cooke *et al.*, *J. Physiol.* **517**, 617 (1999).
[19] F. Takens, in *Dynamical Systems and Turbulence*, Lecture Notes in Mathematics edited by D. Rand and L. S. Young (Springer-Verlag, Berlin, 1981), Vol. 366, pp. 366—381
[20] J. Theiler *et al.*, *Physica D* **58**, 77 (1992).
[21] G. Weiss, *J. Appl. Probab.* **12**, 831 (1975).
[22] D. T. Kaplan *et al.*, *Biophys. J.* **59**, 945 (1991).
[23] A. Porta *et al.*, *Comput. Cardiol.* **31**, 645 (2004).
[24] K. R. Casali *et al.*, *FASEB J.* **A564**, 612.8 (2007).
[25] A. Porta *et al.*, *Comput. Cardiol.* **31**, 265 (2004).
[26] A. Porta *et al.*, *J. Appl. Physiol.* **103**, 1143 (2007).
[27] N. Montano *et al.*, *Circulation* **90**, 1826 (1994).
[28] D. Lucini *et al.*, *J. Hypertens.* **18**, 281 (2000).

6.2. ARTIGO 2

Título: “Heart rate irreversibility under sympathetic predominance condition: graded sympathetic activation in humans and experimental model of hypertension”

Status: Artigo escrito a submeter.

Objetivo: Verificar a relação existente entre a presença de não linearidades e ativação simpática aplicando o método de detecção de irreversibilidade baseada em teste bidimensional múltiplo. O teste foi aplicado a series de tacograma em situações de predominância simpática fisiológica, patológica e patológica tratada com enalapril para verificar a influência da inibição da enzima conversora da angiotensina sobre a irreversibilidade.

Conclusão: Existe uma relação entre irreversibilidade e ativação simpática sendo mais evidente sob estimulação fisiológica mais acentuada. A aplicação sob condição patológica, também demonstrou um aumento da irreversibilidade. Porém o mecanismo envolvido nesta patologia possui ação mais lenta podendo ser detectado apenas com o uso do teste bidimensional múltiplo, reforçando sua relevância também em situações fisiológicas como hipertensão. O tratamento com enalapril reduziu a modulação simpática e restabeleceu o padrão de não linearidade a valores semelhantes ao grupo controle.

HEART RATE IRREVERSIBILITY UNDER SYMPATHETIC PREDOMINANCE CONDITION: GRADED SYMPATHETIC ACTIVATION IN HUMANS AND EXPERIMENTAL MODEL OF HYPERTENSION

Karina Rabello Casali¹, Mariane Bertagnolli¹, Adriane Belló-Klein¹, Adenauer Girardi Casali⁴, Eleonora Tobaldini⁴, T. Gneccchi-Ruscone⁶, Alberto Porta⁵, Nicola Montano⁴, Katya Rigatto², Maria Claudia Irigoyen^{1,3}

¹ Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

³ Unidade de Hipertensão, Instituto do Coração, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁴ Dipartimento di Scienze Cliniche, Medicina Interna II, Ospedale L. Sacco, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy.

⁵ Dipartimento di Tecnologie per la Salute, Istituto Ortopedico Galeazzi, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy.

⁶ Dipartimento di Cardiologia, Ospedale S.L. Mandic, Merate, Lecco, Italy.

TIME REVERSIBILITY ON SYMPATHETIC ACTIVATION AND HYPERTENSION

Manuscript Word Count: 2677

Abstract Word Count: 231

Number of Figures: 3

Corresponding author: Karina Rabello Casali

Departamento de Fisiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Sarmento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil. Zip Code: 90050-170

E-mail: rabellocasali@gmail.com

Telephone: 55 (51) 3308-3621. Fax Number: 55 (51) 3308-3656.

ABSTRACT

Statistical irreversibility is a fundamental property to evaluate a dynamical system disequilibrium. Previous studies suggest significant heart rate irreversibility changes in conditions characterized by sympathetic modulation predominance.

To test whether the reversibility alterations are related to sympathetic activation (SA) in physiological and pathological conditions, we applied an irreversibility analysis test. The test is based on multiple bi-dimensional tests, to short-term heart rate time series during a progressive SA induced by graded head-up tilt, in humans, and in hypertensive rats. Animals were treated or not with an angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEi), which reduces the SA.

At highest tilt table inclinations, we detected more frequently low dimensional irreversibility ($L=2$), suggesting a more important role of nonlinear mechanisms during maximal SA. However, irreversibility changes occur only at highest degrees of table inclination, indicating that irreversibility is weakly related to the progressive changes in SA. The multiple tests showed an irreversibility percentage increase at higher dimensions. On the other hand, the increase was constant as a function of the tilt table inclination, indicating that SA does not affect irreversibility at higher dimensions.

In a pathological condition accompanied by SA, as seen in SHR, the multiple tests showed an statistical irreversibility (SI) increase at higher dimensions, but a decrease of SI after ACEi. These results suggest that SA is associated to nonlinear mechanisms acting on hypertension with a time delay bigger than in health conditions.

Keywords: non linear methods, irreversibility, SA, hypertension experimental models.

INTRODUCTION

The development of new non-linear approaches provides a new perspective in investigating neural control of cardiovascular system [1]. Among several aspects of a time series that can be quantified, time reversibility has recently gained attention in biology and medicine [2,3]. This attention is related to the capacity of time irreversibility analysis to detect non linear dynamics [4-6], and indicate the existence of disequilibrium states [7], i.e. two fundamental properties of living dynamical systems. Heart rate changes are mainly mediated through the modulation of sympathetic and vagal neural activities. Physiological behavior of these neural outflows is characterized by reciprocal ratio around an equilibrium state.

Recent analysis applied to heart rate in physiological or pathological conditions characterized by sympathetic predominance, such as aging and heart failure [7], reported significant decrease on low dimensional statistical irreversibility.

Multidimensional irreversibility studies [13] applied to heart rate in physiological conditions suggest an important increase of high dimensional irreversible dynamics during standing. This is probably due to regulation in the cardiovascular system which is usually performed via multiple feedback loops, incorporating different delays. Thus, leading to systems that can be high dimensional and might show time scales characterized by different dynamical properties including a different degree of statistical irreversibility.

To test whether this time irreversibility, as a function of the embedding dimension L , is related to SA in physiological conditions, a multidimensional time irreversibility test was applied to short-term heart rate time series during a progressive SA induced by graded tilt at 0, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 degrees. In addition, to verify this property in pathological condition, the method was applied in heart rate time series collected from

normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats (SHR). SHR is an animal model of hypertension, with a chronic SA very similar to human hypertension. Also we use the treatment with an angiotensin converting enzyme inhibitor, enalapril, which reduces the arterial pressure and SA in humans and SHR due to rennin-angiotensin system influence over the autonomic balance.

METHODS

In time series analysis, a signal is said to be reversible if its statistical properties are invariant with respect to time reversal, otherwise it is said to be irreversible. From this definition, reversible time series have the joint probability of $(x(i)x(i+1), \dots, x(i+L-1))$ indistinguishable from that of $(x(i+L-1), x(i+L-2), \dots, x(i))$, where L is the embedding dimension.

A - Bidimensional test for irreversibility analysis

Given a stationary time series $x = \{x(i), i = 1, \dots, N\}$ and the series of vectors

$$x_L = \{(x(i), x(i+\tau), \dots, x(i+(L-1))), i = 1, \dots, N - (L-1)\tau\},$$

constructed using the technique of the delayed coordinates [9], x_L is said to be reversible if the probability distribution of x_L is not significantly different from that of

$$x_L^r = \{(x(i+(L-1)\tau), \dots, x(i+\tau), x(i)), i = 1, \dots, N - (L-1)\tau\},$$

obtained after reversing time's arrow in each vector $x_L(i)$. This should hold for any L and any τ . In this work we used $\tau = 1$ without any a priori assumption regarding the dimension L .

Most of the irreversibility tests [8,10-12] are devised for $L=2$ (i.e. they consider points in the plane $x_L = (x(i), x(i+1))$, with respect to the main diagonal line $x(i) = x(i+1)$) [10]. Indeed, by definition, this asymmetry is incompatible with time reversibility. Fig 1 shows an example of reversible and irreversible signals in $L=2$. The RR series at rest (b) is reversible: indeed, the distribution of points in the scatter plot (b) is symmetric with respect to the main diagonal line $x(i) = x(i+1)$. On the contrary, the RR series during 90 degrees head-up tilt (d) is irreversible since the scatter plot (e) is asymmetric with respect to $x(i) = x(i+1)$.

B - Multiple test strategy for irreversibility analysis

Our study uses the correspondence between time irreversibility and asymmetry of the distribution to apply a multi-dimensional test of time reversibility in stationary series [13].

Let us consider the plane $x_L = (x(i+m), x(i+n))$ with $m, n = 0, \dots, L-1$ and $m \neq n$ and denote with $d_{m,n}(i)$ the distance between the point $x_L = (x(i+m), x(i+n))$ and the main diagonal $x(i+m) = x(i+n)$ (i.e. $d_{m,n}(i) = k(x(i+n) - x(i+m))$ with $k = 2(-1/2)$). Our test evaluates L -dimensional irreversibility by checking the asymmetry of the distribution of points obtained by projecting the L -dimensional reconstructed dynamics onto any orthogonal reference plane $(x(i+m), x(i+n))$ with $m, n = 0, \dots, L-1$. This can be done by testing the asymmetry of the distribution of $d_{m,n}$ for any $m, n = 0, \dots, L-1$ and $m \neq n$ with respect to 0. The obvious relationships $d_{m,n}(i) = -d_{n,m}(i)$ and $d_{m,n}(i) = d_{0,(n-m)}(i+m)$ for $n > m$ limit the number of tests to be performed in a stationary time series to $L-1$ (i.e. we need to test the asymmetry of the distribution of $d_{0,m}$ with $m = 1, \dots, L-1$).

Any asymmetry measure can be applied to the $d_{0,m}$ distribution. In this study we used the skewness S_m of $d_{0,m}$,

$$S_m = \frac{\sum_{i=1}^{N-m} d_{0,m}(i)^3}{\left(\sum_{i=1}^{N-m} d_{0,m}(i)^2\right)^{3/2}}$$

with $m=1, \dots, L-1$ [12]. When S_m is significantly different from 0 for a specific m with $m \leq L-1$, the series is labeled as irreversible in the $(m+1)$ -dimensional phase space. If x is irreversible in the $(m+1)$ -dimensional phase space, it is said to be L -irreversible for any $L > m$.

To check if S_m is significantly different from 0 it was utilized a set of 500 iteratively-refined amplitude-adjusted Fourier transform (IAFFT) surrogates with random phases but

with power spectrum and distribution of the original series preserved [14]. The null hypothesis is that x is generated by a linear process being reversible at least up to the dimension L eventually distorted by a static non linear transformation that does not alter reversibility of x .

Figure 2 shows the distribution of the skewness index S_m derived from 500 surrogates during rest in $L=2$ (d) and 90 degrees tilt in $L=2$ (e) and $L=3$ (f). The dotted lines indicate the 2.5th and 97.5th percentiles and the continuous lines indicate the skewness of the original series in each experimental condition. Both at rest (0 degrees) and during 90 degrees tilt are reversible at $L=2$ (a,b), while during 90 degrees tilt at $L=3$ (c) the skewness index of the original series is outside the confidence interval and the signal is irreversible.

C - Experimental protocol – Graded sympathetic activation

We studied 17 healthy humans (age 21-54, 7 females and 10 males). The subjects were laying down on the tilt table and the ECG was recorded while supine (0°) and during 15, 30, 45, 60, 75, 90 degrees head-up tilt (10 minutes for each step). The sequence of tilt angles was randomly chosen within the set. Each tilt session was always preceded by a supine session (7 minutes) and followed by 3 minutes of recovery. The signals were sampled at 1000 Hz and the ECG (lead II) was sampled at 300 Hz (12 bit precision). Heart period was derived as the temporal distance between two consecutive QRS complexes. We applied the irreversibility test to heart period (HP) beat-to-beat series (200 to 300 cardiac beats) derived from ECG.

D - Experimental protocol – Hypertension model

Male 25 week-old Wistar Kyoto and SHR, weighting 250-300 grams, were obtained from the University of São Paulo (São Paulo, Brazil). The rats were divided into four groups: Wistar Kyoto (WKY-T) and SHR (SHR-T) treated with enalapril (10 mg/Kg;

n=7) or tap water (WKY-C and SHR-C; n=7) by intragastric gavage for ten weeks. Body weight was measured every week to adjust the drug doses. The animals were housed in temperature controlled rooms (22°C) with a 12:12-h dark-light cycle and received standard laboratory chow and water ad libitum. All animal protocols were in accordance with the Guidelines for Ethical Care of Experimental Animals and were approved by the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre Ethical Committee.

Rats were anesthetized with intramuscular injection of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg), forty-eight hours after the last treatment day. A polyethylene catheters (PE-10, 0.28 mm ID, 0.61 mm OD, Biocorp Australia, Huntingdale, Victoria, Australia) filled with heparinized saline solution, were inserted into the femoral artery for direct measurements of arterial pressure (AP). Conscious arterial pressure recording was performed following the protocol described previously [15]. One day after the surgical procedure, catheter was connected to a strain gauge transducer (Narco Biosystem Pulse Transducer RP-155, Houston, Texas, USA) linked to a pressure amplifier (General Purpose, Stemtech, Wood Dale, IL, USA). Pulsatile AP was continuously recorded, during 30 minutes with an analogue-to-digital conversion board (Windaq, 2 kHz sampling frequency, Dataq Instruments, Inc., Akron, Ohio, USA). The files were stored and the data were analyzed later.

RESULTS

Table 1 shows the percentages of subjects with irreversibility in $L=2$ and with $L=5$ during head-up tilt at 0, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 degrees. Figure 3 shows the same percentages in terms of bargraphs. The black bars correspond to the percentages at $L=2$, while the white part indicates the additional percentage when L is increased from $L=3$ to $L=5$.

Results in pathological condition characterized by SA are showed in Table II. When there is an increase of SA, the analysis in hypertensive rats showed an increase of SI at higher dimensions in SHR-C group, compared to normotensive animals (WKY-C),. In SHR-T group, the ACEi decreases SI when accompanied by SA reduction.

DISCUSSION

There is an increase of the irreversibility percentage at highest tilt table inclinations (60, 75 and 90 degrees), indicating that nonlinear mechanisms are more active during maximal SA. However, changes of irreversibility occur only at highest degrees of table inclination, indicating that statistical irreversibility in heart rate variability series is weakly related to the progressive changes of SA.

Moreover, when passing from $L = 2$ to $L = 5$, the multiple tests showed an increase of irreversibility percentage at higher dimensions, but the increase was constant as a function of the tilt table inclination. This result indicate that the progression of SA obtained through gradual head-up tilt protocol did not affect irreversibility at higher dimensions.

In hypertension, accordingly to studies in other pathological situations characterized by SA, the results showed statistical irreversibility in heart rate variability series, at $L=2$ is not related to SA. On the other hand, there is an increase of irreversibility percentages at $L=5$, indicating an association between SI and SA with a time delay related to the non-linear mechanism. This suggests that, in hypertension, SA is associated to nonlinear mechanisms acting in this pathologic condition with time delays bigger than in health conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge support from the FAPERGS/ CNPq / CAPES / Brazil, FIRST 2005 grant from the University of Milan and other grants from the University of Milan. The animals hemodynamic techniques were performed using equipments from Physiology Department of Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

REFERENCES

- [1]. N. Montano, C. Cogliati, G. Costantino, et al. (2008), "Heart rate variability explored in the frequency domain", *Neurosci Biobehav Rev.*;33(2):71-80, 2009.
- [2]. C. Diks, J.C. van Houwelingen, F. Takens and J. DeGoede, "Reversibility as a Criterion for Discriminating Time Series," *Physics Letters A*, vol. 201, pp. 221-228, 1995.
- [3]. M. J. van der Heyden, M. J. Diks, J.P.M. Pijn and D.N. Velis, "Time reversibility of intracranial human EEG recordings in medial temporal lobe epilepsy," *Physics Letters A*, vol. 216, pp283-288, 1996.
- [4]. C. Braun, P. Kowallik, A. Freking, D. Haderler, K. Kniffki, and M. Meesmann, "Demonstration of nonlinear components in heart rate variability of healthy persons," *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, vol. 275, pp. H1577-H1584, 1998.
- [5]. T. Schreiber and A. Schmitz, "Surrogate time series," *Physica. D*, vol.142, pp. 346-382, 2000.
- [6]. T. Schreiber and A. Schmitz, "Discrimination power of measures for nonlinearity in a time series," *Physical Review E*, vol. 55, pp. 5443-5447, 1997.
- [7]. I. Prigogine and I. Antoniou, "Laws of Nature and Time Symmetry Breaking," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 879, pp. 8-28, 1999.
- [8]. M. Costa, A. L. Goldberger, C.K. Peng, "Broken asymmetry of the human heartbeat: loss of time irreversibility in aging and disease," *Physical Review Letters*, vol. 95, pp. 198102, 2005.
- [9]. F. Takens, "On the numerical determination of the dimension of an attractor, dynamical systems and turbulence," *Lecture Notes in Mathematics*, vol. 898, pp. 366-381, Springer

Verlag, Berlin, 1981.

[10]. A. Porta, S. Guzzetti, N. Montano, T. Gneccchi-Rusccone, R. Furlan, and A. Malliani, "Time reversibility in short-term heart period variability," *Computers in Cardiology 2006*, vol. 33, pp. 77-80, 2006.

[11]. P. Guzik, J. Piskorski, T. Krauze, A. Wykretowicz, H. Wysocki, "Heart rate asymmetry by Poincaré plots of RR intervals," *Biomed Tech.*, vol. 51 pp. 272-275, 2006.

[12]. C. L. Ehlers et. al, "Low doses of ethanol reduce evidence for nonlinear structure in brain activity," *Journal of Neuroscience*, vol. 18, pp.7474-7486, 1998.

[13] K.R Casali, A. G. Casali, N. Montano, M. C. Irigoyen, F. Macagnan, S. Guzzetti, and A. Porta, "Multiple Testing Strategy for the Detection of Temporal Irreversibility in Stationary Time Series," *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*.vol.77, pp.066204, 2008.

[14]. J. Theiler, S. Eubank, A. Longtin, B. Galdrikian, J. D. Farmer, "Testing for nonlinearity in time series: the method of surrogate data," *Physica D*, vol. 58, pp.77-94, 1992.

[15]. E. Rabelo, K. De Angelis, P. Bock, T. Gatelli Fernandes, F. Cervo, A. Belló Klein, N. Clausell, M. C. Irigoyen. Baroreflex sensitivity and oxidative stress in adriamycininduced heart failure. *Hypertension*; vol. 38, pp. 576–580, 2001.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 - Examples of heart period (HP) at rest (0 degrees) (a) and during 90 degrees tilt (d). The scattergrams of $HP(i + 1)$ vs $HP(i)$ during rest (b), $HP(i + 1)$ vs $HP(i)$ during 90 degrees tilt (e); distributions of $HP(i+1)-HP(i)$ during rest (c), $HP(i+1)-HP(i)$ during 90 degrees tilt (f). The series in (a) is reversible, while that in (d) is irreversible.

Figure 2 - Examples of multiple test irreversibility analysis. Scattergrams of $HP(i + 1)$ vs $HP(i)$ at rest (a), $HP(i + 1)$ vs $HP(i)$ during 90 degrees tilt (b) and $HP(i + 2)$ vs $HP(i)$ (c) during 90 degrees tilt and the relevant distributions of the skewness index over 500 surrogates (d,e,f) with indicated the skewness of the original series. The dotted lines indicate the 95% confidence interval of surrogates and the continuous lines indicate the skewness S_m of the original series. RR series are reversible both at rest (0 degrees) and 90 degrees tilt in $L=2$ (a,b), while during 90 degrees tilt in $L=3$ (c) the RR series is irreversible.

Figure 3 - Percentage of irreversible signals during graded tilt with table inclination angles of 0, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 degrees. The black bar corresponds to analysis with $L=2$, while the white part indicates the additional irreversibility cases when L is increased up to $L=5$.

TABLES

Table I – Percentages of irreversibility during graded sympathetic activation

Tilt Degrees	L=2	L≤5
0 ^o	46%	65%
15 ^o	41%	53%
30 ^o	59%	71%
45 ^o	35%	53%
60 ^o	65%	77%
75 ^o	53%	77%
90 ^o	71%	89%

Table II – Percentages of irreversibility in SHR rats

Group	L=2	L≤5
WKY control	29%	29%
WKY treated	23%	12%
SHR control	21%	59%
SHR treated	28%	31%

FIGURES

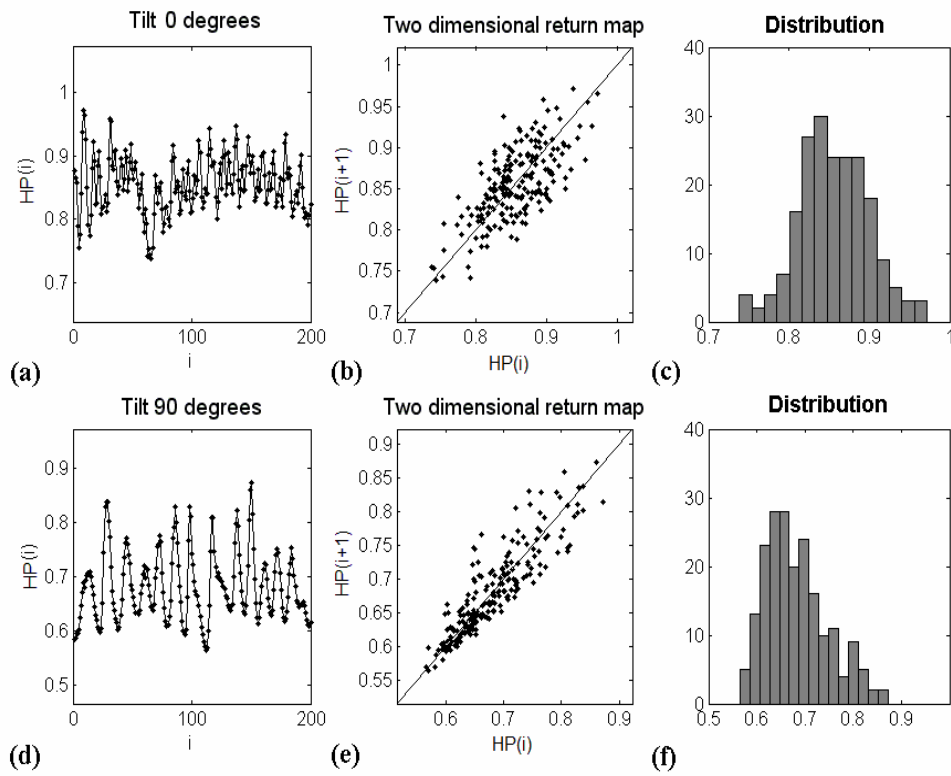


Figure 1 (a, b, c, d, e, f).

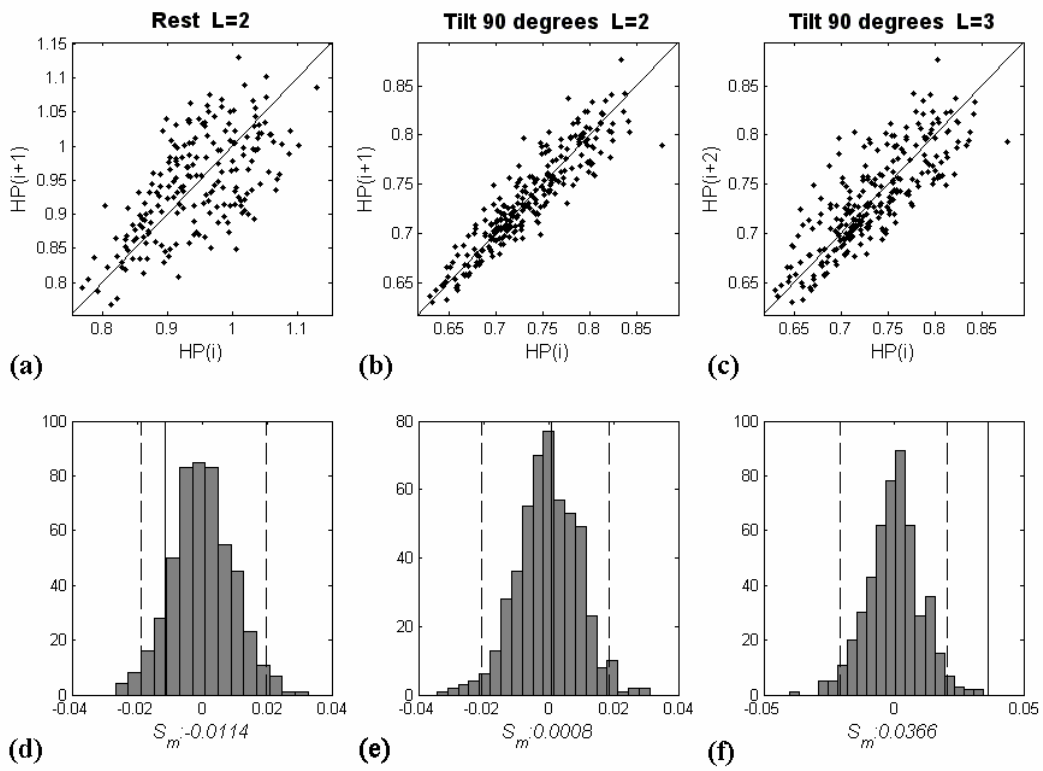


Figure 2 (a, b, c, d, e, f).

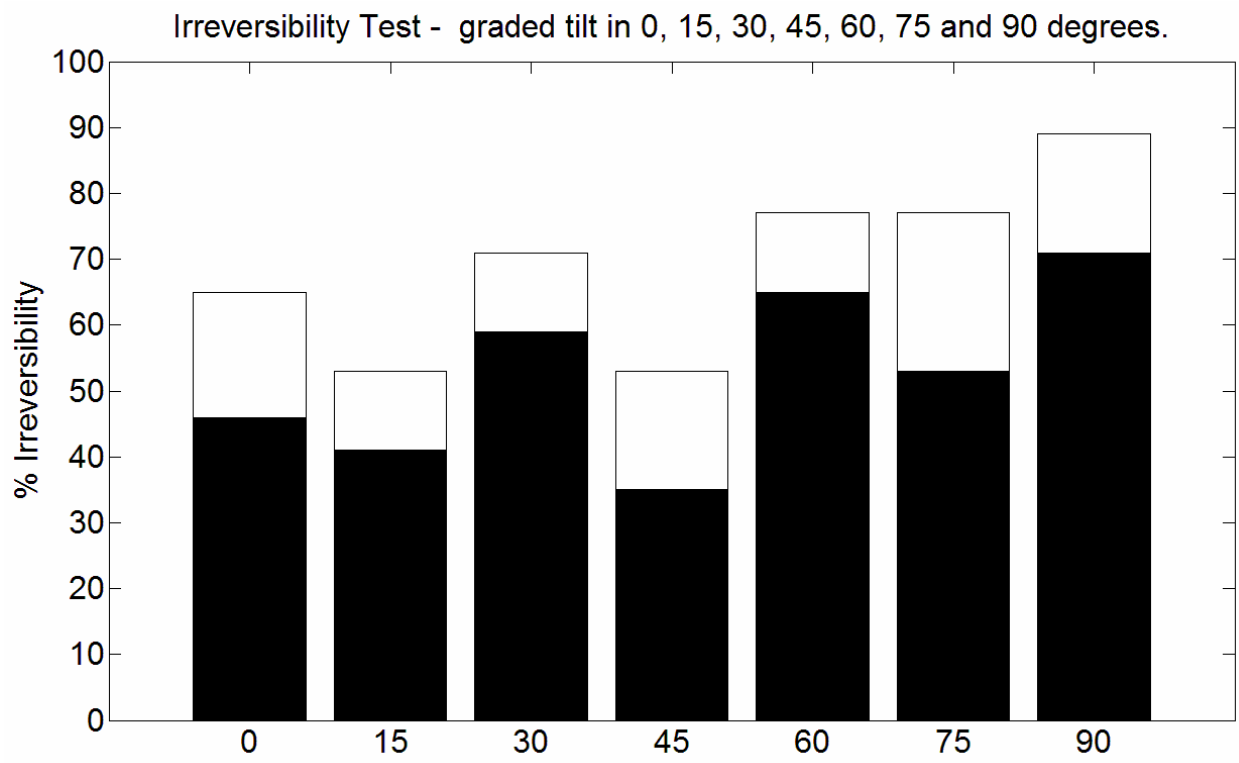


Figure 3

6.3. ARTIGO 3

Título: “Low-dose angiotensin converting enzyme inhibitor improves autonomic control, oxidative stress and cardiac hypertrophy in hypertensive rats”

Status: Artigo submetido à Cardiovascular Research.

Objetivo: Testar a hipótese que o tratamento com um inibidor da enzima conversora da angiotensina pode reduzir a hipertrofia ventricular esquerda em ratos hipertensos, através do decréscimo da ativação simpática e estresse oxidativo, mesmo sem a redução da pressão arterial.

Conclusão: Nosso estudo foi o primeiro a demonstrar que o tratamento com um inibidor da enzima conversora da angiotensina em baixa dose pode melhorar o perfil oxidativo e reduzir a hipertrofia ventricular esquerda modificando o balanço simpatovagal cardíaco independentemente de seus efeitos sobre a pressão arterial ou a frequência cardíaca.

Editorial Manager(tm) for Cardiovascular Research
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: LOW-DOSE ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITOR IMPROVES AUTONOMIC CONTROL, OXIDATIVE STRESS AND CARDIAC HYPERTROPHY IN HYPERTENSIVE RATS

Short Title: LOW-DOSE ACEi IMPROVES AUTONOMIC CONTROL IN SHR

Article Type: Original Article

Keywords: ACE inhibitors, cardiac hypertrophy, autonomic nervous system, cardiac oxidative stress, hypertension.

Corresponding Author: Dr. Karina Rabello Casali, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Federal University of Rio Grande do Sul

First Author: Karina R Casali, PhD

Order of Authors: Karina R Casali, PhD; Mariane Bertagnolli, PhD; Adriane Belló-Klein, PhD; Alex S Araujo, PhD; Adenauer G Casali, PhD; Eleonora Tobaldini, M.D.; Alberto Porta, PhD; Nicola Montano, PhD; Katya Rigatto, PhD; Maria C Irigoyen, PhD

LOW-DOSE ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITOR IMPROVES AUTONOMIC CONTROL, OXIDATIVE STRESS AND CARDIAC HYPERTROPHY IN HYPERTENSIVE RATS.

Karina Rabello Casali¹, Mariane Bertagnolli¹, Adriane Belló-Klein¹, Alex Sander Araujo¹, Adenauer Girardi Casali⁴, Eleonora Tobaldini⁴, Alberto Porta⁵, Nicola Montano⁴, Katya Rigatto², Maria Claudia Irigoyen^{1,3}

¹ Department of Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² Department of Physiologic Sciences, Federal University of Healthy Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

³ Hypertension Unit, Heart Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁴ Department of Clinical Sciences, L. Sacco Hospital, University of Milan, Milan, Italy.

⁵ Department of Technology for Health, Orthopedic Institute Galeazzi, University of Milan, Milan, Italy.

Manuscript Word Count: 3923.

Corresponding author: Karina Rabello Casali.

Departamento de Fisiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Sarmento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil. Zip Code: 90050-170

E-mail: rabellocasali@gmail.com

Telephone: +55 (51) 3308-3621. Fax Number: +55 (51) 3308-3656.

LOW-DOSE ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITOR IMPROVES AUTONOMIC CONTROL, OXIDATIVE STRESS AND CARDIAC HYPERTROPHY IN HYPERTENSIVE RATS

Karina Rabello Casali, Mariane Bertagnolli, Adriane Belló-Klein, Alex Sander Araujo, Adenauer Girardi Casali, Eleonora Tobaldini, Alberto Porta, Nicola Montano, Katya Rigatto, Maria Claudia Irigoyen.

AIMS: To test the hypothesis that angiotensin converting enzyme inhibitor treatment may reduce left ventricular hypertrophy in hypertensive rats, by decreasing sympathetic activation and oxidative stress, even without lowering arterial blood pressure.

METHODS: We performed experiments on spontaneously hypertensive rats (SHR), chronically treated with the angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEi) enalapril at low (n=5) or high (n=6) dose, or with placebo (n=6). In all the groups we assessed cardiovascular autonomic control by means of spectral analysis of heart rate and blood pressure variability (HRV and BPV), oxidative stress and left ventricular hypertrophy (LVH).

RESULTS: Compared to placebo, high-dose ACEI was associated with a significant reduction in arterial pressure and heart rate. Spectral analysis revealed a significant decrease of sympathetic modulation to both cardiac and vascular level. Moreover cardiac oxidative stress and LVH were significantly reduced. Similarly, low-dose ACEi shifted the cardiac sympathovagal balance towards a parasympathetic predominance and reduced significantly cardiac oxidative stress and LVH, however without modifying arterial pressure and heart rate.

CONCLUSION: Our study is the first to demonstrate that low dose angiotensin-converting enzyme inhibitor may improve the oxidative status and reduce LVH through modification of cardiac sympathovagal balance independently upon its effects on blood pressure and heart rate.

INTRODUCTION

Hypertension is one of the major health care problems worldwide since it markedly increases the risk for development of heart disease, stroke, generalized vascular disease, and renal failure. Inhibition of renin-angiotensin system (RAS) activity using angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) or angiotensin II receptor blockers (ARBs) is beneficial in patient populations with hypertension.

RAS system is associated with cardiovascular and renal disorders independently of its blood pressure increasing effects,^{1,2} and one of its most important actions is mediated through activation of sympathetic nervous system by AT₁ receptor stimulation, acting on cardiac sympathetic nerve terminals.³

Left ventricular hypertrophy (LVH) is a strong predictor of cardiovascular events and all-cause mortality in patients with hypertension. RAS inhibition treatment reduces the risk for adverse cardiovascular events in patients with hypertension and LVH and the benefits are correlated with the regression of LVH,⁴ independently upon reduction in arterial blood pressure.^{5,6} Indeed, in experimental models of hypertension, the treatment with non-antihypertensive doses of angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEi), was reported to be able of reducing cardiac hypertrophy without changing blood pressure.⁷ However, the mechanisms underlying these effects are still largely unknown.

In spontaneous hypertensive rats (SHR), an experimental model of hypertension characterized by sympathetic overactivity, it has been recently observed that exercise training was associated with a reduction in cardiac hypertrophy likely to be due to the reduction in oxidative stress and sympathetic outflow.⁸ On the other hand, a significant positive correlation between left ventricular weight and cardiac tissue Angiotensin II in SHR was previously reported,⁹ explaining the reduction of myocardial hypertrophy in rats treated with angiotensin converting enzyme inhibitors.

Studies have demonstrated that ACE inhibitors decrease efferent sympathetic nerve activity¹⁰ and increase cardiac baroreflex sensitivity in hypertensive animals.¹¹ However in all the above studies a pharmacological hypotensive dose was used.

Therefore, to test the hypothesis that ACEi treatment may reduce LVH, even without lowering arterial blood pressure, decreasing sympathetic activation and oxidative stress, we chronically administered enalapril at low and high dose, compared to placebo, to three groups of SHR rats and evaluated the effects on heart rate variability, oxidative stress and LVH.

METHODS

Animals

Male 25 week-old SHR, weighting 250-300 grams, were obtained from the University of São Paulo (São Paulo, Brazil). The rats were treated with enalapril at low-dose (0.1 mg/Kg; SHR-LD; n=5), or high-dose (10 mg/Kg; SHR-HD; n=6) or tap water (SHR-C; n=6) administered by intragastric gavage for ten weeks. Body weight was measured every week to adjust the drug doses. The animals were housed in temperature controlled rooms (22°C) with a 12:12-h dark-light cycle and received standard laboratory chow and water ad libitum. The investigation conforms with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NHI Publication No. 85-23, revised 1996). All animal protocols were approved by the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre Ethical Committee.

Hemodynamic Measurements

Rats were anesthetized with intramuscular injection of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg), forty-eight hours after the last treatment day. A polyethylene catheters (PE-10, 0.28 mm ID, 0.61 mm OD, Biocorp Australia, Huntingdale, Victoria, Australia) filled with heparinized saline solution, were inserted into the femoral artery for direct measurements of arterial pressure (AP). Conscious arterial pressure recording was performed following the protocol described previously.¹² One day after the surgical procedure, catheter was connected to a strain gauge transducer (Narco Biosystem Pulse Transducer RP-155, Houston, Texas, USA) linked to a pressure amplifier (General Purpose, Stemtech, Wood Dale, IL, USA). Pulsatile AP was continuously recorded, during 30 minutes with an analogue-to-digital conversion board (Windaq, 2 kHz sampling frequency, Dataq Instruments, Inc., Akron, Ohio, USA). The files were stored and data was analyzed later.

Spectral Analysis

After detecting the pulse intervals, the heart period was automatically calculated on a beat-to-beat basis as the time interval between two consecutive systolic peaks or pulse interval (PI). All

detections were carefully checked to avoid erroneous detections or missed beats. Sequences of 200-300 beats were randomly chosen and if the randomly selected sequence included evident non stationarities the sequence was discarded and a new random selection was performed. Frequency domain analysis of heart rate variability (HRV) and blood pressure variability (BPV) was performed with an autoregressive algorithm¹³⁻¹⁵ on the PI interval sequences (tachogram) and on respective systolic sequences (systogram). The power spectral density was calculated for each time series. In this study, three spectral components were considered: very low frequency (VLF), from 0 to 0.25 Hz; low frequency (LF), from 0.25 to 0.75 Hz; and high frequency (HF), from 0.75 to 3.00 Hz. The spectral components were expressed in absolute (s^2 or $mmHg^2$) and normalized units (nu). Normalization consisted of dividing the power of a given spectral component by the total power and multiplying the ratio by 100.¹⁶

Tissue Collection

After hemodynamic measurements, rats were anesthetized and killed by cervical dislocation. The rat hearts were rapidly excised, weighed, and frozen in a liquid nitrogen medium. The cardiac hypertrophy was evaluated by left ventricle weight (mg) to body weight (g) ratio (LV/BW ratio). Hearts was homogenized as described previously.¹⁷ The supernatant fraction obtained was frozen at $-80^{\circ}C$ and used to determine oxidative stress profile. Protein was measured by the Lowry method,¹⁸ using bovine serum albumin as the standard.

Lipid Peroxidation Analysis

Lipid peroxidation (LPO) was measured by the tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL) assay, as previously described by Gonzalez Flecha et al.¹⁹ The assay was carried out with an LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer 1215 (LKB Producter AB, Bromma, Sweden) in the out-of-coincidence mode at room temperature. Blood samples were heparinized, washed with saline solution and centrifuged three times. Red blood cells were used for the LPO analysis. Heart supernatant fractions were diluted in 140 mmol/L KCl and 20 mmol/L

phosphatate buffer, pH 7.4, which was added to glass tubes placed in scintillation vials. Next, 3 mmol/L of tert-butylhydroperoxide was added, and CL was determined by the maximal emission level. Results were reported as counts per second (cps)/mg of protein.

Antioxidant enzyme activities.

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured spectrophotometrically in heart homogenates by rate inhibition of pyrogallol autooxidation at 420 nm. Enzyme activity was reported as U/mg protein.²⁰ Catalase (CAT) activity was measured by monitoring the decrease in H₂O₂ concentration at 240 nm, and the results are reported as pmol of H₂O₂/mg protein.²¹ Glutathione peroxidase (GPX) activity was determined in cardiac samples by monitoring NADPH oxidation spectrophotometrically at 340 nm, and the results are reported as nmol/min/mg protein.²² Protein concentration was measured by the method of Lowry et al.¹⁸ using bovine serum albumin as the standard.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm SD. Comparisons between SHR groups were performed using one-way ANOVA followed by the Tukey test, considering enalapril treatment as a factor with three levels: no treatment, low and high doses. The significance level was established at $P < 0.05$.

RESULTS

Morphological and Hemodynamic Parameters

Enalapril treatment reduced the LV/BW ratio, a cardiac hypertrophy index, both at low and high dose (Figure 1C). This decrease was independent of arterial pressure because in the low-dose group the treatment didn't change the arterial pressure and heart rate (Figure 1A and B), while the drug modified hemodynamic parameters in SHR-HD group.

Oxidative Stress

Results related to oxidative stress revealed an improvement of oxidative status after high dose treatment. Cardiac lipid peroxidation, assessed by chemiluminescence, was decreased in SHR-HD (Figure 2A and B) as well as in SHR-LD groups. However, plasmatic levels of CL were significantly reduced only in SHR-HD group. Catalase activity, an antioxidant enzyme, was significantly decreased in both SHR-LD and SHR-HD groups, while GPX activity was decreased only in the SHR-HD group, compared to controls. SOD activity did not change in either groups.

Spectral analysis

The SHR-HD group was characterized by a significant change in power spectrum parameters in HRV and systolic BPV spectral profiles (Table II). High dose treatment was associated with a reduction of systolic BPV and of its LF component, both in absolute and normalized values, indicating a reduced vascular sympathetic drive; and also a significant decrease in the LF/HF ratio of HRV. The SHR-LD group did not show any change in systolic BPV profile. However, cardiac sympathovagal balance was significantly affected by the low-dose treatment, reducing the cardiac sympathetic modulation, does normalizing the cardiac sympathovagal balance.

DISCUSSION

The major finding of our study is that low-dose ACEi treatment is associated with reduction in cardiac sympathetic modulation, cardiac oxidative stress and LVH, independently on its effect in lowering blood pressure. In addition, high-dose of ACEi induced also changes in BPV, reducing vasomotor sympathetic drive in addition to the expected decrease in BP.

One of the most interesting results is that the shift in cardiac sympathovagal balance induced by the low-dose ACEi occurred in absence of blood pressure and heart rate changes, thus likely without involvement of baroreflex and average sympathetic nerve activity. A possible explanation of this effect may be related to a direct action of the drug on the central nervous system. Similar behaviour was observed in humans after acute administration of betablockade.²³ It is worth noting that sympathetic nervous system may affect target organ function by 1) modifying the number of spikes/sec, that is the gross average neural activity, or 2) changing the its oscillatory patterns even in absence of modification in sympathetic discharge.²⁴ In addition, results of the present study suggests that a change in the neural oscillatory pattern might be per se inadequate to modify the cardiovascular variables but effective in modifying other system, such as in this case the oxidative one. Of course, being in a closed loop system, we could also hypothesize that the change in sympathovagal balance might be due to the reduction in ROS. Anyway, this alternative hypothesis does not discard the importance of the interaction between autonomic nervous system and the redox system in contributing to the development of cardiac hypertrophy.

It's well known that SHR rats are characterized by an increased sympathetic activation,¹⁴ associated with cardiac oxidative stress and cardiac hypertrophy.⁸ Recent study observed that RAS inhibition was able to decrease LVH even without lowering arterial blood pressure. Reactive oxygen species (ROS) are directly involved in pathological conditions as hypertension and endothelial damage²⁵ and different mechanisms can be responsible to ROS generation.^{26,27} For instance, sympathetic activation is able to stimulate ROS production and induce hypertrophy. On the other hand,

sympathetic vasomotor modulation, assessed by SAP variability, was greatly reduced by high dose ACEi but not by the low dose. Due to the correlation existing between sympathetic vasomotor activity and LF of SAP variability, this seems to confirm that at vascular level only the complete blockade of RAS by high dose of ACEi was able to decrease sympathetic discharge and therefore arterial pressure the autonomic modulation on vessels. Moreover, the VLF component, partly related to RAS system modulation decreased significantly only after the high dose.

These changes in autonomic control, assessed by autonomic modulation on HR and SAP, could be explained by the reduction of local ACE activity,²⁸ which can meliorate the oxidative status and, consequently, reduce hypertrophy, improving autonomic modulation. However the causes can be more complex than simply a diminishing of ACE activity, because the ACE inhibition in this enalapril dose was able to change also the arterial pressure.

Chronic hypertension is an important factor in SHR cardiac hypertrophy because the pressure overload stimulates cardiomyocyte hypertrophy as an adaptive response.²⁹

On the other hand, in SHR group treated with low dose, there was no difference in heart rate or arterial pressure when compared to the placebo group. However, even without altering the arterial pressure, the treatment with low dose reduced the cardiac hypertrophy and oxidative status measured by lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. In addition, the autonomic balance was reduced, indicating that, in spite of an unchanged baroreflex sensibility or autonomic vascular modulation, low dose treatment was capable to improve the rate between sympathetic and vagal modulation on heart rate.

Bertagnolli et al.,⁸ has already showed a correlation between oxidative stress, cardiac hypertrophy and sympathetic activity in physiologic condition induced by exercise. In their results, a correlation between lipid peroxidation, hypertrophy and norepinephrine (NE) was found and justified by ROS generation, NE action, increasing systemic NO production and arterial pressure reduction. In our study, the pathological hypertrophy was reduced by partial ACE inhibition with a dose that changed

the cardiac oxidative status. Lipid peroxidation and catalase reduction can be associated to cardiac RAS which under ACE inhibition, could justify an improvement of cardiac oxidative status and, consequently, the reduction of hypertrophy, without explaining the improvement of autonomic balance. On the other side, increased sympathetic activity is strongly related with cardiac oxidative stress.³⁰

In conclusion, our study is the first to demonstrate that low dose ACEi may improve the oxidative status and reduce LVH through modification of sympathovagal balance and oxidative stress without impinging upon blood pressure and heart rate, thus supporting the hypothesis that afterload is not a major determinant per se for the development of LVH, while neural and oxidative signaling play a predominant role.

FUNDING

This work was supported by “Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul” (FAPERGS); “Conselho Nacional de Pesquisa” (CNPq); and “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Tânia Gatelli Fernandes for their technical support.

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

REFERENCES

1. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II mediated cardiovascular and renal disease. *Pharmacol Rev* 2000; **52**:11–34
2. Weir MR, Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens* 1999; **12**: 205S–213S.
3. Rump LC, Schwertfeger E, Schaible U, Fraedrich G, Schollmeyer P. Beta2 adrenergic receptor and angiotensin I receptor modulation of sympathetic neurotransmission in human atria. *Circ Res* 1994; **74**: 434–440.
4. Prisant LM. Management of hypertension in patients with cardiac disease: use of renin-angiotensin blocking agents. *Am J Med* 2008; **121**:S8-15.
5. Chevalier B, Callenselamrani F, Heymes C, Swynghedauw B. Molecular basis of regression of cardiac hypertrophy. *Amer J Cardiol* 1994; **73**:C10-17.
6. Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF. Renin-angiotensin system involved in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Amer J Physiol* 1994; **259**:H324-332.
7. Linz W, Scholkens BA, Ganten D. Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin Exp Hypertens A* 1989; **11**:1325–1350.
8. Bertagnolli M, Schenkel PC, Campos C, Mostarda CT, Casarini DE, Belló-Klein A, *et al.* Exercise training reduces sympathetic modulation on cardiovascular system and cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2008; **11**:1188-93.

9. Nagano M, Higaki J, Mikami H, Nakamaru M, Higashimori K, Katahira K, *et al.* Converting enzyme inhibitors regressed cardiac hypertrophy and reduced tissue angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1991; **9**(7):595-9.
10. Montano N, Gneccchi-Ruscione T, Contini M, Finocchiaro ML, Lombardi F, Malliani A. Effect of captopril on sympathetic preganglionic efferent activity in cats. *Am J Physiol.* 1993; **264**:H345-51.
11. Ichikawa M, Suzuki H, Kumagai K, Kumagai H, Ryuzaki M, Nishizawa M, *et al.* Differential modulation of baroreceptor sensitivity by long-term antihypertensive treatment. *Hypertension* 1995; **26**, 425– 431.
12. Rabelo E, De Angelis K, Bock P, Gatelli Fernandes T, Cervo F, Belló Klein A, Clausell N, Cláudia Irigoyen M. Baroreflex sensitivity and oxidative stress in adriamycininduced heart failure. *Hypertension* 2001; **38**(3 Pt 2):576–580.
13. Malliani, A.; Pagani, M.; Lombardi, F.; Cerutti, S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 1991; **84**:482-492.
14. Dias da Silva Valdo J, Viana Públio CC, de Melo Alves R, Fazan R Jr, Ruscone TG, Porta A, Malliani A, Salgado HC, Montano N. Intravenous amiodarone modifies autonomic balance and increases baroreflex sensitivity in conscious rats. *Auton Neurosci.* 2002; **95**(1-2):88-96.
15. Porta, 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.
16. Montano N, Ruscone TG, Porta A, Lombardi F, Pagani M, Malliani A. Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. *Circulation.* 1994; **90**(4):1826-31.

17. Araujo, A., A. Enzweiler, et al. Oxidative stress activates insulin-like growth factor I receptor protein expression, mediating cardiac hypertrophy induced by thyroxine. *Mol Cell Biochem* 2007; **303**,n.1-2:89-95.
18. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folinphenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**:265–275.
19. Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 1991; **10**:93–100.
20. Marklund S, Orelund L, Perdahl E, Winblad B. Superoxide dismutase activity in brains from chronic alcoholics. *Drug Alcohol Depend* 1983; **12**:209–215.
21. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; **105**:121–126.
22. Flohé L, Günzler W. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; **105**:114–121.
23. Cogliati, C.; Colombo, S.; Gneccchi-Ruscione, T.; Gruosso, D.; Porta, A.; Montano, N.; *et al.* Acute b-Blockade Increases Muscle Sympathetic Activity and Modifies Its Frequency Distribution. *Circulation* 2004; **110**:2786-2791.
24. Montano N, Cogliati C, Porta A, Pagani M, Malliani A, Narkiewicz K, *et al.* Central vagotonic effects of atropine modulate spectral oscillations of sympathetic nerve activity. *Circulation* 1998;**98**:1394-9.
25. Tsu S, Touyz RM. Reactive oxygen species and vascular remodelling in hypertension: still alive. *Can J Cardiol* 2006; **22**: 947–951.
26. Sowers JR: Hypertension, angiotensin II and oxidative stress. *N Engl J Med* 2002; **346**: 1999–2001.

27. Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signalling in vascular cells implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* 2004; **37**: 1263–1273.
28. Raasch W, Bartels T, Schwartz C, Häuser W, Rütten H, Dominiak P. Regression of ventricular and vascular hypertrophy: are there differences between structurally different angiotensin-converting enzyme inhibitors? *J Hypertens*. 2002; **20**(12):2495-504.
29. Richey P, Brown S. Pathological versus physiological left ventricular hypertrophy: a review. *J Sports Sci* 1998; **16**:129–141.
30. Neri M, Cerretani D, Fiaschi A, Laghi P, Lazzerini P, Maffione A, *et al*. Correlation between cardiac oxidative stress and myocardial pathology due to acute and chronic norepinephrine administration in rats. *J Cell Mol Med* 2007;**11**:156–170.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 – Hemodynamic and morphometric results. (A) Systolic arterial pressure (SAP); (B) heart rate, HR; and (C) left ventricle/body weight ratio, LV/BW ratio in SHR groups. Values presented as mean \pm SD. * $P < 0.05$ vs control group.

Figure 2 – Cardiac oxidative stress assessed by (A) lipid peroxidation, (B) catalase activity in SHR groups. Values presented as mean \pm SD. * $P < 0.05$ vs control group.

Figure 3 – Results of systolic arterial pressure variability analysis. (A) Systolic arterial pressure variability (SAPV); (B) low frequency component of SAPV (LF); and (C) very low frequency component of SAPV (VLF); and in SHR groups. Values presented as mean \pm SD. * $P < 0.05$ vs control group.

Figure 4 – Results of heart rate variability (HRV) analysis and baroreflexa sensibility. (A) relation between low and high frequency components of HRV (LF/HF rate) and (B) alpha index related to baroreflexa sensibility in SHR groups. Values presented as mean \pm SD. * $P < 0.05$ vs control group.

TABLES

Table I – Hemodynamic parameters and spectral analysis results

	SHR – C	SHR – LD	SHR – HD
MAP (mmHg)	156.82 ± 13.58	154.87 ± 7.48	122.84 ± 13.02*
DAP (mmHg)	129.54 ± 15.42	125.98 ± 7.07	98.15 ± 10.13
SAP (mmHg)	186.42 ± 10.11	185.18 ± 9.16	158.02 ± 7.07
HR (bpm)	348.31 ± 35.10	314.03 ± 27.32	296.94 ± 36.44
HRV - var (s²)	0.07 ± 0.06	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.03
- LF (s ²)	4.01 ± 2.23	4.92 ± 2.82	2.80 ± 2.19
- LF (nu)	41.23 ± 30.75	21.47 ± 5.21	7.32 ± 4.18*
- HF (s ²)	2.88 ± 2.93	18.66 ± 11.08*	14.02 ± 11.21
- HF (nu)	58.77 ± 30.75	78.53 ± 5.21	92.68 ± 4.18*
- LF/HF index	1.64 ± 0.89	0.28 ± 0.08*	0.24 ± 0.12*
SAPV – var (mmHg²)	74.63 ± 74.94	40.45 ± 25.89	10.94 ± 5.03*
-VLF (mmHg ²)	56.71 ± 37.34	49.49 ± 15.81	5.04 ± 6.83*
- LF (mmHg ²)	15.21 ± 14.86	11.39 ± 8.27	1.94 ± 1.64*
- HF (mmHg ²)	3.16 ± 1.93	7.42 ± 6.16	46.27 ± 71.23*
Alpha LF index (s/mmHg)	0.56 ± 0.36	0.70 ± 0.12	0.83 ± 0.50

Values reported as mean ± SD. Mean arterial pressure, MAP; Diastolic arterial pressure, DAP; Systolic arterial pressure, SAP; Heart rate, HR; Heart rate variability, HRV; very low frequency component, VLF; low frequency component, LF; high frequency component, HF; normalized unit, nu. * P < 0.05 compared with control group.

Table II – Blood and cardiac lipid peroxidation and cardiac antioxidant enzyme activity

	SHR - C	SHR - LD	SHR - HD
Blood CL (cps/mg protein)	22238.92 ± 5803.58	17369.03 ± 7451.68	12903.12 ± 2988.69
CL (cps/mg protein)	41597.03 ± 4408.23	25404.63 ± 3901.40*	21664.02 ± 1972.16*
SOD (U/mg protein)	9.69 ± 1.15	8.42 ± 0.95	8.51 ± 0.48
CAT (pmol/mg protein)	212.50 ± 40.735	145.02 ± 29.48*	117.06 ± 12.91*
GPX (nmol/min/mg protein)	46.36 ± 4.96	39.99 ± 6.32	32.85 ± 1.50*

Values reported as mean ± SD. Chemiluminescence, CL; Superoxide dismutase, SOD; Catalase, CAT; Glutathione peroxidase, GPX. * p < 0.05 compared with control group.

FIGURES

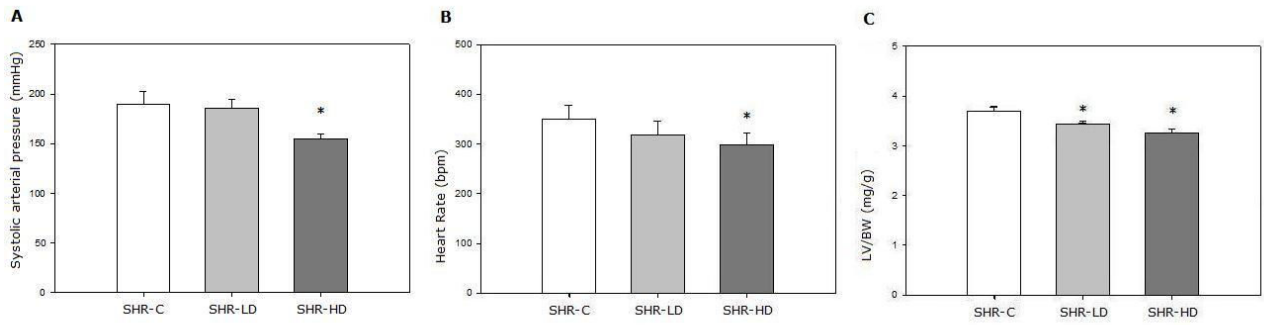


Figure 1

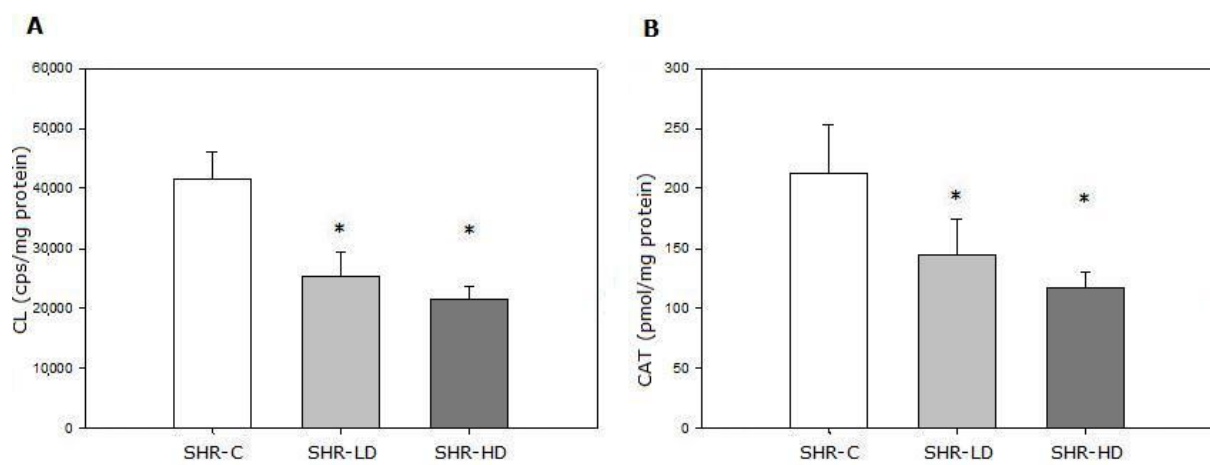


Figure 2

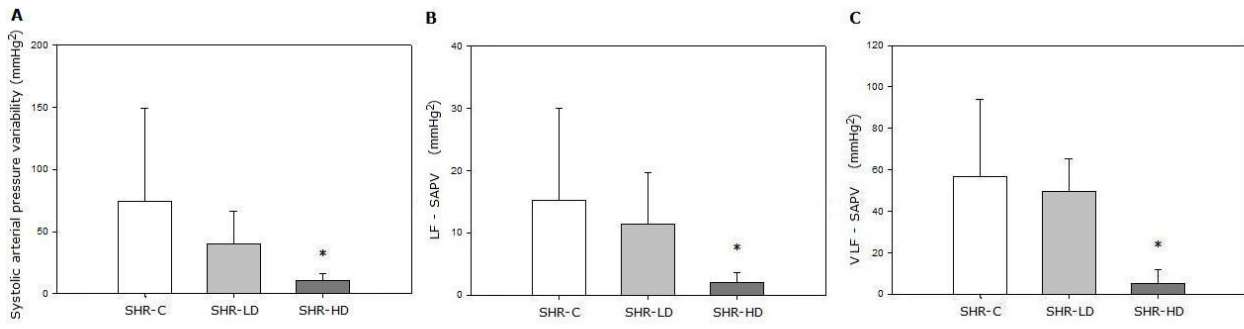


Figure 3

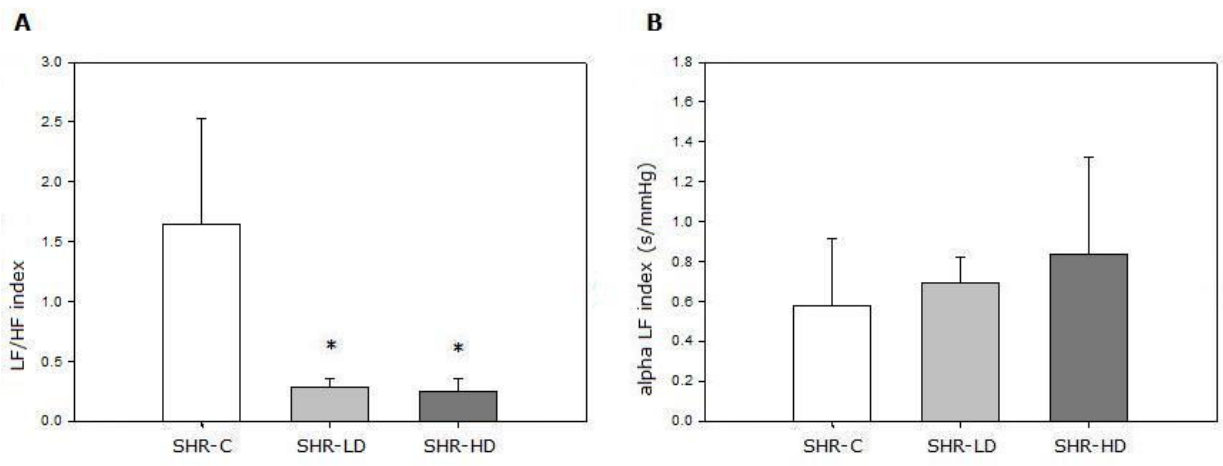


Figure 4

7. DISCUSSAO CONCLUSIVA

O trabalho apresentado teve como objetivo avaliar o efeito da inibição do SRA sobre o controle autonômico e o estresse oxidativo em ratos espontaneamente hipertensos.

Para esta avaliação foram propostos métodos matemáticos lineares e não-lineares que possibilitam o estudo do balanço simpatovagal no controle da PA e da FC. Por serem métodos capazes de obter resultados de forma muito segura para os pacientes, poderão constituir no futuro uma ferramenta de profunda importância na identificação de possíveis alterações do controle autonômico nas mais diversas patologias, entre elas a hipertensão arterial sistêmica.

Como método não linear foi utilizada a análise de irreversibilidade temporal apontada na literatura como uma propriedade relacionada ao sistema nervoso simpático. A maioria dos métodos de análise de irreversibilidade considera a relação existente entre pontos consecutivos na série, ou seja, envolvendo mecanismos que agem em batimentos consecutivos, no caso de séries temporais de intervalo de pulso (Costa et al, 2005; Porta et al., 2006; Guzik et al., 2006). Entretanto, em certas situações fisiológicas e patológicas pode haver a predominância de mecanismos de ação que estariam agindo com atrasos temporais maiores (Porta et al., 2004; Blaber et al., 2005). Buscando adaptar um dos métodos de análise de tal propriedade estatística a tais situações, no artigo 1 foi proposto um método novo de análise multidimensional que permite a avaliação de sistemas dinâmicos agindo não apenas em batimentos consecutivos mas também com atrasos de até 4 batimentos. Este artigo valida o método ao aplicá-lo a sinais teóricos, gerados por simulação de situações fisiopatológicas, e testa a situação de estimulação simpática

através de um protocolo padrão aplicado em humanos. Os resultados obtidos evidenciam a importância do uso do método multidimensional, sobretudo em situações cujos mecanismos fisiológicos envolvidos interagem com sistemas de retro-alimentação com escalas temporais variadas, como o caso da manobra postural ativa (Porta et al., 2004).

No artigo 2, o novo método já validado, é aplicado a situações fisiológicas e patológicas caracterizadas pela predominância da atividade simpática: estimulação por ortostatismo gradual em humanos e hipertensão em modelo animal de ratos espontaneamente hipertensos. Além disso, para testar também o caso de redução do componente simpático, um grupo de animais hipertensos foi tratado com um inibidor da enzima conversora da angiotensina, que reduz tal modulação.

Os resultados obtidos no artigo 2 demonstram, em situação fisiológica, uma relação não linear entre a estimulação simpática e a irreversibilidade que fica evidente apenas em altos padrões de estimulação. Além disso, a análise multidimensional indica a presença de um mecanismo não linear rápido com ação predominante em batimentos consecutivos sem uma contribuição adicional em dimensões maiores, o que concorda com estudos prévios (Casali et al, 2008). Os resultados obtidos nos SHR mostraram que, em situação patológica como a hipertensão arterial sistêmica, não houve alteração nos mecanismos não lineares rápidos que agem sobre batimentos consecutivos nesses animais hipertensos, quando comparados aos seus controles normotensos. Esse achado concorda com o trabalho de Costa e colaboradores (2005) que avaliaram os mecanismos não lineares envolvidos na insuficiência cardíaca congestiva e encontraram uma redução da irreversibilidade. A partir desses resultados os autores relacionam a perda de padrões não lineares a situações patológicas. Entretanto, nos resultados obtidos no grupo SHR do artigo 2, existe um aumento importante da irreversibilidade em altas dimensões, indicando, também nessa situação patológica, uma associação de mecanismos não

lineares à predominância da atividade simpática. Tais mecanismos passam a agir neste modelo de hipertensão com um atraso maior, provavelmente devido à presença de prejuízos com origens endoteliais, teciduais e/ou cardíacas, envolvidos na hipertensão arterial sistêmica. Sabendo que o bloqueio do SRA, pela administração de iECA promove a redução da modulação simpática em casos de hipertensão (Raasch et al., 2002), aplicamos tal tratamento para verificar se a irreversibilidade alto-dimensional está associada à ação do sistema nervoso simpático. De fato, a análise espectral demonstrou que o tratamento com um iECA reduziu a modulação simpática e a análise multidimensional apontou uma redução da irreversibilidade alto-dimensional, indicando a associação entre SNS e não linearidades mesmo considerando atrasos temporais maiores.

Além deste método não linear, também estudamos a aplicação de um método linear, já bem estabelecido, a séries temporais de pressão arterial e frequência cardíaca. Os resultados de tal aplicação podem ser observados no artigo 3, que, através da análise espectral, nos permitiu avaliar não apenas o balanço autonômico e sua modulação sobre a FC, como também a modulação simpática sobre os vasos. Além disso, este tipo de análise apresenta a vantagem de possibilitar a avaliação também da modulação exercida pelo sistema renina angiotensina sobre a pressão arterial sistólica, uma vez que nos permite estudar a componente VLF, ligada a este sistema.

Dessa forma, no artigo 3 são apresentados os resultados do tratamento com um inibidor da enzima conversora da angiotensina em uma dose anti-hipertensiva e outra que não reduziu significativamente a PA. Este estudo teve com o objetivo verificar os efeitos da inibição da ECA, independentes daqueles relacionados à redução da PA.

O tratamento com iECA em baixa dose reduziu a modulação simpática cardíaca, estresse oxidativo cardíaco e hipertrofia ventricular esquerda, independentemente do seu efeito anti-hipertensivo. Além disso, a alta dose de iECA também induziu modificações na variabilidade da pressão arterial, reduzindo a modulação simpática vascular além da redução esperada na PA.

Um dos resultados mais interessantes é que o deslocamento do equilíbrio simpátovagal cardíaco induzido pela baixa dose de iECA ocorreu na ausência de modificações na pressão sanguínea e frequência cardíaca, portanto, provavelmente, sem o envolvimento da atividade baroreflexa ou nervosa simpática. Uma explicação possível deste efeito pode estar relacionada a uma ação direta da droga sobre o sistema nervoso central. Um comportamento semelhante foi observado em humanos após a administração aguda de beta-bloqueadores (Cogliati et al., 2004). Sabe-se que o sistema nervoso simpático pode alterar a função cardíaca modificando o número de picos/segundo, isto é, a atividade neural média, ou alterando o seu padrão oscilatório mesmo na ausência de modificações na descarga simpática (Montano et al., 1998).

Além disso, os resultados do nosso estudo sugerem que uma modificação no padrão oscilatório neural poderia ser insuficiente para modificar as variáveis cardiovasculares, mas eficaz para modificar outros sistemas, como neste caso o balanço oxidativo. Naturalmente, sendo um sistema de realimentação fechado, também podemos supor que a modificação no balanço simpátovagal poderia ser devido à redução das espécies ativas de oxigênio. De qualquer forma, esta hipótese não descarta a importância da interação entre o sistema nervoso autônomo e o sistema redox no desenvolvimento, em particular, da hipertrofia cardíaca.

É bem estabelecido na literatura que ratos SHR apresentam aumento da ativação simpática (Dias da Silva et al., 2002), do estresse oxidativo e hipertrofia cardíaca (Bertagnolli et al., 2008). As espécies ativas de oxigênio estão diretamente envolvidas às condições patológicas como hipertensão e disfunção endotelial (Tsu e Touyz, 2006) e diferentes mecanismos podem ser responsáveis pela geração destes radicais (Sowers, 2002; Touyz, 2004). Por exemplo, a ativação simpática é capaz de estimular a produção EAO e induzir a hipertrofia. Por outro lado, a modulação simpática vascular, avaliada pela variabilidade da PAS, foi reduzida pela alta dose de iECA mas não pela baixa dose.

Devido à correlação que existe entre a atividade simpática vascular e a componente LF da variabilidade da PAS, isto parece confirmar que, a nível vascular, apenas o bloqueio do SRA pela alta dose de iECA foi capaz de reduzir a descarga simpática e, por esse motivo, a pressão arterial e a modulação simpática nos vasos.

Além disso, nossos resultados mostram uma redução da potência da componente VLF da variabilidade da PA nos animais tratados com alta dose de iECA. Sabemos que, em ratos, há uma associação entre o SRA e esta faixa de frequências VLF (Stauss, 2007), caracterizada por um aumento da potência desta componente quando o SRA é estimulado (Ponchon et al., 1993; Ponchon e Elghozi, 1996; Blanc et al., 2000). Assim, a redução significativa da componente VLF observada no nosso estudo indica que a modulação de SRA sobre a pressão arterial diminuiu significativamente após a administração de alta dose de iECA e que o tratamento em baixa dose não foi suficiente para alterar a ação sistêmica do SRA sobre a pressão arterial.

Essas modificações no controle autonômico, avaliadas pela modulação autonômica sobre a FC e a PAS, poderiam ser explicadas pela redução da atividade do SRA local (Raasch et al., 2002), que pode melhorar o padrão oxidativo e,

conseqüentemente, reduzir a hipertrofia, melhorando a modulação autonômica. Contudo as causas podem ser mais complexas do que simplesmente uma diminuição na participação do SRA, pois a dose alta de enalapril foi capaz também de reduzir a pressão arterial.

A hipertensão arterial sistêmica crônica é uma causa importante no aparecimento da hipertrofia cardíaca em ratos SHR. A sobrecarga de pressão estimula a hipertrofia do cardiomiócito como uma resposta adaptativa (Richey e Brown, 1998). No grupo SHR tratado com a dose baixa, não houve nenhuma diferença na frequência cardíaca ou pressão arterial quando comparado ao grupo placebo. Entretanto, mesmo sem alterar a pressão arterial, o tratamento com a dose baixa foi capaz de reduzir a hipertrofia cardíaca e o estado oxidativo medido pela lipo-peroxidação e pela atividade de enzimas antioxidantes. Da mesma forma, o balanço autonômico foi reduzido, indicando que, apesar da sensibilidade baroreflexa e da modulação vascular autonômica estarem aparentemente inalteradas, o tratamento em baixa dose foi capaz de melhorar a razão entre a modulação simpática e vagal sobre o coração.

Bertagnolli e colaboradores (2008) demonstraram uma correlação entre estresse oxidativo, hipertrofia cardíaca e atividade simpática na condição de hipertrofia fisiológica induzida por exercício. Seus resultados demonstraram uma correlação entre a peroxidação lipídica, hipertrofia e norepinefrina (NE), provavelmente devido a geração EAO, ação da NE, aumento sistêmico na biodisponibilidade de óxido nítrico e redução de pressão arterial. No nosso estudo, a hipertrofia patológica foi reduzida pela inibição parcial do SRA com uma dose que modificou o estado oxidativo cardíaco. A lipo-peroxidação e a redução da catalase podem estar associadas ao SRA cardíaco que, sobre inibição do SRA, poderia justificar a melhora do estado oxidativo cardíaco e, conseqüentemente, a redução da hipertrofia, sem explicar a melhora do balanço autonômico. Por outro lado, a atividade

simpática aumentada está fortemente relacionada ao estresse oxidativo cardíaco (Neri et al., 2007).

Sendo assim, no artigo 3 demonstramos que o tratamento com iECA em baixa dose pode melhorar o estado oxidativo cardíaco e reduzir a hipertrofia ventricular esquerda provavelmente devido a melhora do balanço simpatovagal e do estresse oxidativo sem, no entanto, interferir na pressão arterial e frequência cardíaca. Esses resultados suportam a hipótese de que as sinalizações neural e oxidativa parecem desempenhar um papel importante em presença ou não de hipertensão.

Assim, em relação à primeira hipótese apresentada neste trabalho que buscava alterações independentes da redução da pressão arterial, nossos resultados apresentados no artigo 3, indicam que o bloqueio mesmo que parcial do SRA apresenta benefícios que estão além da redução da pressão, apresentando também efeitos locais sobre o coração e sobre o estresse oxidativo, reduzindo a hipertrofia e melhorando o controle autonômico. De acordo com nossos resultados, tal alteração indica uma ação provavelmente central, em busca de um novo ponto de equilíbrio simpatovagal. Relacionado à segunda hipótese proposta, que abordava aos mecanismos não lineares presentes na hipertensão arterial sistêmica, o artigo 2 aponta, ao contrário da associação entre estados patológicos e perda de irreversibilidade proposta por alguns autores, a presença de mecanismos não lineares associados a situações patológicas, como a hipertensão em SHR. Esta descoberta só foi possível com o uso do método de irreversibilidade multidimensional, desenvolvido por nosso grupo e apresentado no artigo 1. Após o tratamento com enalapril, tal irreversibilidade multidimensional é reduzida, provavelmente devido a sua ação sobre a modulação simpática vascular.

8. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nos trabalhos desenvolvidos nesta tese deixam algumas perspectivas.

Em relação ao estudo feito administrando baixa dose de um inibidor da enzima conversora da angiotensina, os resultados abrem espaço para novos questionamentos com relação à interação entre o estresse oxidativo, hipertrofia, SRA local e balanço autonômico. Apesar de haver um envolvimento evidente entre todas variáveis, o mecanismo responsável por desencadear essa cadeia de alterações ainda não parece claro. Uma alternativa seria buscar responder a pergunta sobre a participação do SRA na alteração do balanço autonômico, quantificando as concentrações dos principais peptídeos no coração e nas estruturas cerebrais envolvidas no controle autonômico. Outra opção seria avaliar o papel do estresse oxidativo utilizando métodos de quantificação mais precisos tanto a nível central como local.

Por outro lado, o método desenvolvido para análise de irreversibilidade permite quantificar uma propriedade estatística relacionada à dinâmica envolvida no controle da frequência cardíaca. Tal propriedade, por estar relacionada a mecanismos fisiológicos, abre perspectivas no estudo de novas ferramentas aplicáveis não só ao estudo de patologias como na busca de índices matemáticos possivelmente capazes de ajudar no prognóstico clínico. Considerando a importância da hipertensão arterial sistêmica na saúde pública, a busca de novas ferramentas de avaliação, sobretudo não invasivas, que ajudem no diagnóstico e tratamento otimizados e em um prognóstico preciso, torna-se uma meta de grande relevância na pesquisa clínica.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121–126.

Allard J, Buleon M, et al. ACE inhibitor reduces growth factor receptor expression and signaling but also albuminuria through B2-kinin glomerular receptor activation in diabetic rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* 2007; 293:F1083–F1092.

Araujo A, Enzweiler A, et al. Oxidative stress activates insulin-like growth factor I receptor protein expression, mediating cardiac hypertrophy induced by thyroxine. *Mol Cell Biochem*, v.303, n.1-2, 2007 Sep, p.89-95. 2007.

Baker KM, Chernin MI, et al. Renin-angiotensin system involved in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Amer J Physiol* 1994; 259:H324-332.

Baselli G, Cerutti S, et al. Model for the assessment of heart period and arterial pressure variability interactions and of respiration influences. *Med Biol Eng Comput* 1994; 32:143–152.

Bertagnolli M, Campos C, et al. Baroreflex sensitivity improvement is associated with decreased oxidative stress in trained spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 2006; 24:2437-2443.

Bertagnolli M, Schenkel P, et al. Exercise Training Reduces Sympathetic Modulation on Cardiovascular System and Cardiac Oxidative Stress in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Hypertens* 2008; .

Bing, O. H., Conrad C. H, et al. Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *Heart Fail. Rev.* 2002; 7(1):71–88.

Blaber AP, Yamamoto Y, Hughson RL. Change in phase relationship between SBP and R-R interval during lower body negative pressure. *Am J Physiol.* 1995 Apr;268(4 Pt 2):H1688-93.

Blanc J, Lambert G, Elghozi JL. Endogenous renin and related short term blood pressure variability in the conscious rat. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 394: 311–20.

Casali AG, Casali KR. The SiSyPhus Project: BioMedical Data Analysis Package. Version 1.01b. University of Milan, 2007.

Casali KR, Casali AG, et al. Multiple testing strategy for the detection of temporal irreversibility in stationary time series. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2008; 77(6 Pt 2):066204.

Cerutti C, Barres C, Paultre C. Baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variabilities in rats: assessment by spectral analysis. *Am J Physiol.* 1994 May;266(5Pt 2):H1993-2000.

Chevalier B, Callenselamrani F, et al. Molecular basis of regression of cardiac hypertrophy. *Amer J Cardiol* 1994; 73:C10-17.

Cogliati C, Colombo S, Gneccchi-Ruscione T, et al. Acute β -Blockade Increases Muscle Sympathetic Activity and Modifies Its Frequency Distribution. *Circulation* 2004; 110:2786-2791.

Costa M, Goldberger AL, Peng CK. “Broken asymmetry of the human heartbeat: loss of time irreversibility in aging and disease,” *Physical Review Letters* 2005; 95:198102.

Couture R, Girolami JP. Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 2004; 500:467–485.

De Champlain J et al. Effects of trandolapril on the sympathetic tone and reactivity in systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1994; 73: 18–25.

Dias da Silva V J, Viana Públio CC, et al. Intravenous amiodarone modifies autonomic balance and increases baroreflex sensitivity in conscious rats. *Auton Neurosci*. 2002; 95(1-2):88-96.

Dias da Silva V J, Montano N, Salgado H C, et al. Effects of long-term angiotensin converting enzyme inhibition on cardiovascular variability in aging rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 2006; 124: 49–55.

Diks C, Van Houwelingen JC, et al. “Reversibility as a Criterion for Discriminating Time Series,” *Physics Letters A* 1995; 201:221-228.

Doggrell AS. Losartan for LIFE in hypertension with left ventricular hypertrophy? *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2003; 4:115-118.

Dostal DE. The cardiac renin-angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. *Regul Pept* 2000; 91:1–11.

Farah, VMA, De Angelis K, et al. Autonomic modulation of arterial pressure and heart rate variability in hypertensive diabetic rats. *Clinics* 2007; 62(4):477-82.

Fazan R Jr, de Oliveira M, et al. Frequency-dependent baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variability in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Nov;289(5):H1968-75.

Filho A G, Ferreira AJ, et al. Selective increase of angiotensin(1-7) and its receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. *Exp. Physiol.*, v.93, p.589-598, 2008..

Flohé L, Günzler W. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105:114–121.

Franchi F et al. Cardiac autonomic tone during trandolapril-irbesartan low-dose combined therapy in hypertension: a pilot project. *Journal of Human Hypertension* 2002; 16:597–604.

Frank, G., S. Eguchi, et al. Involvement of reactive oxygen species in the activation of tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase by angiotensin II. *Endocrinology* 2000; 141(9):3120-6.

Gasparo M, Hess P, et al. Combination of non-hypotensive doses of valsartan and enalapril improves survival of spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction. *Journal of the Renin- Angiotensin- Aldosterone System* 2000 Volume 1 Number 2.

Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 1991; 10:93–100.

González, A., M. Fortuño, et al. Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2003; 59(3):549-62.

Giattanasio C et al. Sympatho-moderating influence of benazepril in essential hypertension. *J Hypertens* 1992; 10: 373–378.

Goldberger JJ, Challapalli S, et al. Relationship of heart rate variability to parasympathetic effect. *Circulation* 2001, 103(15):1977-83.

Goldin JR, Raymundo MM. *Pesquisa em saúde e direito dos animais*. 2° ed. HCPA, Porto Alegre/RS, 1997.

Guzik P, Piskorski J, et al. "Heart rate asymmetry by Poincaré plots of RR intervals," *Biomed Tech* 2006; 51:272-275.

Ichikawa M, Suzuki H, et al. Differential modulation of baroreceptor sensitivity by long-term antihypertensive treatment. *Hypertension* 1995; 26:425– 431.

Iwasaki K, Zhang R, et al. Dose-response relationship of the cardiovascular adaptation to endurance training in healthy adults: how much training for what benefit? *J Appl Physiol* 2003; 95(4):1575-83.

Kawano Y, Yoshida K, et al. Chronic effects of central and systemic administration of losartan on blood pressure and baroreceptor reflex in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension* 1994; 7:536-542.

Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II mediated cardiovascular and renal disease. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 11–34.

Lévy, S. Drug Insight: angiotensin-converting-enzyme inhibitors and atrial fibrillation-- indications and contraindications. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3(4):220-5.

Li J, Gall N, et al. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension* 2002, 40(4):477-84.

Linz W, Scholkens BA, Ganten D. Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin Exp Hypertens A* 1989; 11:1325–1350.

Lowry O, Rosebrough N, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-75.

Mainardi LT, Bianchi AM, et al. Pole-tracking algorithms for the extraction of time-variant heart rate variability spectral parameters. *IEEE Trans Biomed Eng* 1995; 42(3):250-9.

Makikallio TH, Koistinen J, et al. Heart rate dynamics before spontaneous onset of ventricular fibrillation in patients with healed myocardial infarcts. *Am J Cardiol* 1999; 83:880–884.

Malliani A, Pagani M, et al. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 1991; 84:482-492.

Malliani A, Montano N. Heart rate variability as a clinical tool. *Ital Heart J.* 2002 Aug;3(8):439-45. Review.

Mancia G, Parati G, et al. Effects of sinoaortic denervation on frequency-domain estimates of baroreflexa sensitivity in conscious cats. *Am J Physiol* 1999, 276: H1987-93.

Mancia G, Omboni S, Parati G. The importance of blood pressure variability in hypertension. *Blood Press Monit.*2000;5 Suppl 1:S9-S15.

Marklund S, Orelund L, et al. Superoxide dismutase activity in brains from chronic alcoholics. *Drug Alcohol Depend* 1983; 12:209–215.

Matsubara BB, Matsubara LS, et al. The effect of non-antihypertensive doses of angiotensin converting enzyme inhibitor on myocardial necrosis and hypertrophy in young rats with renovascular hypertension. *Int J Exp Path* 1999; 80:97-104.

Mizuno K, Tani M, et al. Effects of losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, on cardiac hypertrophy and the tissue angiotensin II content in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences* 1992;51: 367-374.

Mohazzab-H K, Kaminski P, et al. Lactate and PO₂ modulate superoxide anion production in bovine cardiac myocytes: potential role of NADH oxidase. *Circulation* 1997; 96(2):614-20.

Montano N, Gneccchi-Rusccone T, et al. Effect of captopril on sympathetic preganglionic efferent activity in cats. *Am. J. Physiol* 1993; 264:H345– H351.

Montano N, Gneccchi-Rusccone T, et al. Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. *Circulation* 1994; 90:1826–1831.

Montano N, Porta A, et al. Heart rate variability explored in the frequency domain: A tool to investigate the link between heart and behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 2009;33(2):71-80.

Moraes RS, Ferlin EL, et al. Three-dimensional return map: a new tool for quantification of heart rate variability. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 2000; 83:90–99.

Mosterd A, Cost B, et al. The prognosis of heart failure in the general population: The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 2001; 22:1318-1327.

Nagano M, Higaki J, et al. Converting enzyme inhibitors regressed cardiac hypertrophy and reduced tissue angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens* 1991 Jul;9(7):595-9.

Nakamura K, Fushimi K, et al. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II. *Circulation* 1998; 98(8):794-9.

Neri M, Cerretani D, et al. Correlation between cardiac oxidative stress and myocardial pathology due to acute and chronic norepinephrine administration in rats. *J Cell Mol Med* 2007;11:156–170.

Nickenig G, Harrison DG. The AT1-Type Angiotensin Receptor in Oxidative Stress and Atherogenesis: Part I: Oxidative Stress and Atherogenesis. *Circulation* 2002;105:393-396.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.* 1963; 27: 282-293.

Omvik P, Gerds E, et al. Longterm central hemodynamic effects at rest and during exercise of losartan in essential hypertension. *American Heart Journal* 2000; 140: 624-630.

Osterziel KJ, Dietz R, et al. ACE inhibition improves vagal reactivity in patients with heart failure. *Am Heart J* 1990;120:1120–1129.

Osterziel KJ, Rohrig N, et al. Influence of captopril on the arterial baroreceptor reflex in patients with heart failure. *Eur Heart J* 1988;9:1137–1145.

Pagani M, Somers V, et al. Changes in autonomic regulation induced by physical training in mild-hypertension. *Hypertension* 1988; 12: 600–610.

Pancera P et al. Effect of losartan on heart rate and blood pressure variability during tilt test and trinitroglycerine vasodilation. *J Hypertens* 1999; 17: 513–521.

Parati G, Saul JP, et al. Spectral analysis of blood pressure and heart rate variability in evaluating cardiovascular regulation. A critical appraisal. *Hypertension* 1995; 25(6):1276-86.

Pecis M, Azevedo MJ, et al. Autonomic dysfunction and urinary albumin excretion rate are associated with an abnormal blood pressure pattern in normotensive normoalbuminuric type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2000; Jul;23(7):989-93.

Ponchon P, Elghozi J-L. Contribution of the renin–angiotensin and kallikrein–kinin systems to short-term variability of blood pressure in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1996; 297: 61–70.

Ponchon P, Grichois M-L, Elghozi J-L. Effect of losartan on short-term variability of blood pressure of renovascular hypertensive rats: A spectral study. *J. Hypertens.* 1993; 11: S244–5.

Porta A, Addio GD, et al. Testing the presence of non stationarities in short heart rate variability series. *Computers in Cardiology* 2004;31:645-648.

Porta A, Guzzetti S, et al. “Time reversibility in short-term heart period variability,” *Computers in Cardiology* 2006; 33:77-80.

Porta A, Casali KR, et al. Temporal asymmetries of short-term heart period variability are linked to autonomic regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 295(2):R550-7.

Porta A, Guzzetti S, 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.

Portero-Otína M, Pamplonaa R, et al. Inhibition of renin angiotensin system decreases renal protein oxidative damage in diabetic rats *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 368(3):528-535.

Raasch W, Bartels T, et al. Regression of ventricular and vascular hypertrophy: are there differences between structurally different angiotensin-converting enzyme inhibitors? *J Hypertens* 2002; 20(12):2495-504.

Reis AF, Bastos BG, et al. Disfunção Parassimpática, Variabilidade da Frequência Cardíaca e Estimulação Colinérgica após Infarto Agudo do Miocárdico. *Arq Bras Cardiol*, 1997; 70(3).

Reznick A, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233:357-63.

Ribeiro AL, Moraes RS, et al. Parasympathetic dysautonomia precedes left ventricular systolic dysfunction in Chagas disease. *Am Heart J* 2001; 141(2):260-5.

Rongen AG et al. Neural and hypotensive effects of angiotensin II receptor blockade. *Hypertension* 1998; 31: 378–383.

Rump LC et al. Beta2 adrenergic receptor and angiotensin I receptor modulation of sympathetic neurotransmission in human atria. *Circ Res* 1994; 74: 434–440.

Schreiber T, Schmitz A. “Surrogate time series,” *Physica. D* 2000;142:346-382.

Sowers JR. Hypertension, angiotensin II and oxidative stress. *N Engl J Med* 2002; 346: 1999–2001.

Stauss HM. Identification of blood pressure control mechanisms by power spectral analysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34(4):362-8.

Timmemans PBMWM et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993; 45: 205–251;

Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signalling in vascular cells implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 1263–1273.

Tsu S, Touyz RM. Reactive oxygen species and vascular remodelling in hypertension: still alive. *Can J Cardiol* 2006; 22: 947–951.

Van der Heyden MJ, Diks MJ, et al. “Time reversibility of intracranial human EEG recordings in medial temporal lobe epilepsy,” *Physics Letters A* 1996; 216:283-288.

Waynforth HB, Flecknell PA. *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. 2nd. ed. London: Academic Press, p. 276-278, 1992.

Weir MR, Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens* 1999; 12: 205S–213S.

Williams BR, Kim J. Cardiovascular drug therapy in the elderly: theoretical and practical considerations. *Drugs Aging* 2003; 20:445–463.

YAO, En-Hui et al. Losartan Improves the Impaired Function of Endothelial Progenitor Cells in Hypertension via an Antioxidant Effect. *Hypertens Res* 2007; 30(11).

Yu G, Liang X, et al. Diverse effects of chronic treatment with losartan, fosinopril, and amlodipine on apoptosis, angiotensin II in the left ventricle of hypertensive rats. *International Journal of Cardiology* 2001, 81: 123-129.

Zimmerman BG. Adrenergic facilitation by angiotensin: does it serve a physiological function? *Clin Sci* 1981; 60: 343–348.