



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

Victor Hugo de Freitas Morales

**Estudo e Aplicação do Reflexo de Mergulho na Avaliação de Funções Autonômicas
Cardiovasculares no Diabetes Mellitus Tipo 2**

Florianópolis

2022

Victor Hugo de Freitas Morales

Estudo e Aplicação do Reflexo de Mergulho na Avaliação de Funções Autonômicas
Cardiovasculares no Diabetes Mellitus Tipo 2

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do título de Mestre em
Engenharia Elétrica.
Orientador: Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, PhD

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra

Morales, Victor Hugo de Freitas

Estudo e Aplicação do Reflexo de Mergulho na Avaliação de Funções Autonômicas Cardiovasculares no Diabetes Mellitus Tipo 2 / Victor Hugo de Freitas Morales ; orientador, Jefferson Luiz Brum Marques, 2022.

151 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Engenharia Elétrica. 2. Engenharia Biomédica. 3. Funções Autonômicas Cardiovasculares. 4. Diabetes Mellitus Tipo 2. I. Marques, Jefferson Luiz Brum. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica. III. Título.

Victor Hugo de Freitas Morales

Estudo e Aplicação do Reflexo de Mergulho na Avaliação de Funções Autonômicas
Cardiovasculares no Diabetes Mellitus Tipo 2

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Renata Maria Lataro, PhD.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Adriano Alves Pereira, PhD.
Universidade Federal de Uberlândia

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Engenharia Elétrica.

Prof. Telles Brunelli Lazzarin, Dr.
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, PhD.
Orientador

Florianópolis, 2022

Este trabalho é dedicado aos pacientes com Diabetes Mellitus e a minha família.

AGRADECIMENTOS

Jesus, a Ti toda a honra e toda a glória. Trouxeste-me a Florianópolis e realizaste-me um sonho. Cuidastes de mim em todos os momentos, abençoando-me com saúde, sabedoria, disposição e amor. Agradeço pelas pessoas que colocaste em minha vida, pelas aventuras nesta ilha e também pelas dificuldades enfrentadas até aqui; por meio delas, tornei-me um homem melhor. Nunca estive sozinho, sempre estiveste comigo. Agradeço por me escolher, embora eu não mereça. Agradeço por me amar acima de Ti. Esta conquista é Tua!

Em segundo lugar, devo agradecer aos pacientes que gentilmente concordaram em participar do estudo. Agradeço também à equipe do Instituto de Cardiologia de Tupã, em especial, ao Dr. Marcelo Cunha, que solenemente me recebeu no instituto e auxiliou como responsável clínico.

Agradeço com carinho meus pais Cláudio e Fatima e meu irmão Felipe; dedicados, pacientes e amorosos, meus exemplos de honestidade e compaixão. O apoio de vocês foi fundamental para este trabalho. Obrigado por sempre acreditarem em mim. Amo vocês.

Aos colegas de mestrado agradeço pelos trabalhos em equipe e pelo conhecimento compartilhado, em especial, à colega Karla Nakamura, parceira de pesquisa e amiga com quem dividi a maior parte desta jornada de mestrado.

Agradeço à toda Comunidade Evangélica Luterana da Trindade por me receberem com tamanho amor e levarem-me para próximo de Cristo. Em especial, agradeço à família Fabrin pelo carinho e cuidado que sempre tiveram comigo, não só como um membro da comunidade, mas como um filho; um amor que não consigo mensurar. Obrigado por serem tão especiais, vocês também foram fundamentais nesta jornada.

Agradeço aos amigos da Igreja Batista de Tupã, minha cidade natal, que mesmo distantes sempre se fizeram presentes, em especial, aos irmãos Natanael Clemente, Arthur Faustinelli e Gabriel Mendes.

Por fim, meu querido orientador, Prof. Dr. Jefferson Marques, um exemplo de cientista, de ética, dedicação e ao mesmo tempo um amigo, simples e acessível em todo o processo desta dissertação. O seu exemplo de dedicação e competência foi um aprendizado para a minha vida.

For I am convinced that neither death nor life, neither angels nor demons, neither the present nor the future, nor any powers, neither height nor depth, nor anything else in all creation, will be able to separate us from the love of God that is in Christ Jesus our Lord (Rm 8, 38-39).

RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma das emergências de saúde global que mais crescem no século XXI. Dentre as complicações diabéticas mais prevalentes, a neuropatia autonômica cardiovascular (CAN – *Cardiovascular Autonomic Neuropathy*) tem se mostrado preditora independente de mortalidade e fator de risco para progressão de doenças cardiovasculares e outras comorbidades diabéticas; controversamente, é também a complicação mais subdiagnosticada no DM. O método padrão-ouro para avaliação e diagnóstico da CAN são os testes de reflexo autonômico cardiovasculares (CARTs – *Cardiovascular Autonomic Reflex Tests*), e o método complementar mais utilizado é a análise da variabilidade da frequência cardíaca (HRV – *Heart Rate Variability*) com dados coletados no repouso (nível basal). Contudo, a metodologia dos CARTs apresenta certas limitações e estudos recentes têm reportado acurácia diagnóstica maior quando a HRV é analisada com o paciente sob efeito de perturbações fisiológicas (ao invés de no repouso). Com base nisso, o presente trabalho tem como objetivo estudar a utilidade clínica do reflexo de mergulho (DR – *Diving Reflex*) na avaliação de funções autonômicas cardiovasculares e investigar o desempenho diagnóstico da *ultra-short* HRV sob efeito do DR na detecção da CAN. O DR é reconhecido pela capacidade única de co-ativar os sistemas autonômicos parassimpático e simpático; por isso, aparenta grande potencial para avaliação dinâmica das funções autonômicas cardiovasculares. Para investigar essa hipótese, foi realizado um estudo prático de caráter preliminar em amostras da população DM Tipo 2 com diagnóstico positivo e negativo para CAN, tendo como referência amostras da população saudável (negativos para DM e CAN). Foram analisadas as séries de frequência cardíaca (FC) e os índices de HRV a partir do repouso, quando sob efeito do DR e durante a fase de recuperação pós-reflexo. Os resultados do estudo mostraram que o DR impôs carga autonômica significativa nos pacientes sem CAN, induzindo bradicardia mediada pelo aumento da atividade parassimpática cardíaca (queda de $12,3 \pm 4,5\%$ da FC); por outro lado, os pacientes com CAN apresentaram bradicardia significativamente reduzida (queda de $4,82 \pm 2,92\%$ da FC) e tempo de resposta lento ($\sim 2x$) em comparação aos pacientes sem CAN ($p < 0,001$). As análises aprofundadas da HRV ressaltaram evidências de modulação parassimpática cardíaca enfraquecida na CAN (RMSSD, HF e SD1; $p < 0,001$) e revelaram modulação simpática cardíaca também reduzida (LF, SD2 e SD1/SD2; $p \leq 0,03$). Os achados em FC e HRV sugeriram ainda início de diminuição da função parassimpática cardíaca nos pacientes DM2 sem CAN, levantando a hipótese de que a avaliação dinâmica do sistema nervoso autonômico com a aplicação do DR foi capaz de evidenciar alterações mais sutis possivelmente encontradas no início da disfunção autonômica. De modo geral, as análises comparativas das curvas ROC mostraram área embaixo da curva (AUC – *area under the curve*) maior em quase todos os índices de HRV quando sob efeito de perturbações fisiológicas, com acurácia diagnóstica significativamente mais elevada em DFA $\alpha 1$ ($p = 0,041$) e SD1/SD2 ($p = 0,017$) na detecção de CAN, mostrando desempenho diagnóstico superior e sugerindo a inclusão de avaliações dinâmicas de HRV nos testes clínicos de investigação da CAN. Por fim, o DR mostrou ser um recurso efetivo e seguro para gerar carga autonômica nos pacientes, permitindo fazer avaliações dinâmicas não apenas no período pós-reflexo, mas durante o próprio momento de evocação do DR.

Palavras-chave: Resposta ao Mergulho. Reflexo Trigêmeo-cardíaco. Testes de reflexo autonômico cardiovasculares. Variabilidade da Frequência Cardíaca. Neuropatia Autonômica Cardiovascular.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is one of the global fastest-growing health emergencies of the 21st century. Among the most prevalent complications, cardiovascular autonomic neuropathy (CAN) has shown to be an independent predictor of mortality and a risk factor for progression of cardiovascular diseases and other diabetic comorbidities; controversially, it is also the most underdiagnosed complication in DM. The gold standard method for evaluating and diagnosing CAN are the cardiovascular autonomic reflex tests (CARTs), and the complementary method most used is the analysis of heart rate variability (HRV) with data collected at rest (baseline). Nonetheless, CARTs' methodology has certain limitations and recent studies have reported higher diagnostic accuracy when patients are under physiological perturbations. Based on this argument, the present work aims to study the clinical utility of the diving reflex (DR) in the assessment of cardiovascular autonomic functions and to investigate the diagnostic performance of ultra-short HRV under the effect of DR in the detection of CAN. The DR is recognized for its unique ability to co-activate the parasympathetic and sympathetic autonomic systems; therefore, it appears to have great potential to be used in dynamic evaluations of cardiovascular autonomic functions. To investigate this hypothesis, a preliminary study was carried out on samples from the Type 2 DM population with positive and negative diagnoses for CAN, using samples from the healthy population (negative for DM and CAN) as a reference. Heart rate (HR) series and HRV indices were analyzed from collections made at rest, under the effect of the DR and during the recovery phase. The results showed that the DR imposed a significant autonomic load on patients without CAN, inducing bradycardia mediated by increased cardiac parasympathetic activity ($12.3 \pm 4.5\%$ decrease in HR); on the other hand, patients with CAN had significantly reduced bradycardia ($4.82 \pm 2.92\%$ drop in HR) and slow response time ($\sim 2x$) compared to the patients without CAN ($p < 0.001$). HRV analyzes highlighted evidence of weakened cardiac parasympathetic activity in CAN (RMSSD, HF and SD1; $p < 0.001$) and further revealed reduced cardiac sympathetic activity (LF, SD2 and SD1/SD2; $p \leq 0.03$). The findings in HR and HRV also suggested the beginning of a decrease in cardiac parasympathetic function in the DM2 patients negative for CAN, raising the hypothesis that the dynamic evaluation with the DR was able to discover more subtle alterations possibly found at the beginning of the autonomic impairment. In general, the comparative analyzes of ROC curves showed an area under the curve (AUC) bigger in almost all HRV indices when under the effect of physiological perturbations, with significantly higher diagnostic accuracy in DFA $\alpha 1$ ($p = 0.041$) and in SD1/SD2 ($p = 0.017$), showing superior diagnostic performance and suggesting the inclusion of dynamic assessments of HRV in clinical trials to investigate CAN. Finally, the DR proved to be a simple and safe resource to effectively generate autonomic load in patients, allowing dynamic assessments during either the reflex phase and the recovery period.

Keywords: *Diving Response. Trigemino-cardiac Reflex. Cardiovascular Autonomic Reflex Tests. Heart Rate Variability. Cardiovascular Autonomic Neuropathy.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação da CAN proposta por Ewing com base nos resultados anormais dos CARTs.	20
Figura 2 – Anatomia interna do coração em visão frontal: os átrios, os ventrículos, as valvas e o miocárdio.	28
Figura 3 – Anatomia dos vasos sanguíneos: as artérias, as veias e os capilares sanguíneos. Os vasos arteriais possuem maior musculatura lisa e fibras elásticas e os vasos venosos possuem valvas para o retorno venoso.	28
Figura 4 – Dinâmica cardiovascular: as fases do bombeamento cardíaco e o fluxo sanguíneo arterial (vermelho: oxigenado) e venoso (azul: desoxigenado) unidirecional pelo coração e pelas circulações pulmonar e sistêmica.	29
Figura 5 – Potencial de membrana das células miocárdicas: as fases do potencial e a mecânica dos canais iônicos nas (a) células marcapassos e nos (b) cardiomiócitos ventriculares.....	30
Figura 6 – O completo excito-condutor do coração: (a) o complexo no coração e (b) suas estruturas.....	31
Figura 7 – Pressão sanguínea na circulação sistêmica: as ondas de pressão geradas pela contração ventricular percorrem os vasos sanguíneos e diminuem em amplitude com a distância, desaparecendo nos capilares.	33
Figura 8 – O ciclo cardíaco e a formação das ondas, segmentos e intervalos do sinal de ECG. Registro feito pela derivação bipolar D-II. A seta vermelha ilustra o vetor formado pelos eletrodos BD e PE e o sentido da medição.....	36
Figura 9 – Sistema Nervoso Autônomo: divisões simpática e parassimpática.	39
Figura 10 – Interação neuro-cardiogênica e neuro-vascular: caminhos de atuação e inervação do coração e dos vasos sanguíneos pelo sistema nervoso simpático, em vermelho, e sistema nervoso parassimpático, em azul.	40
Figura 11 – Controle neuro-cardiogênico e neuro-vascular: estruturas, vias, atuações e respostas fisiológicas.....	42
Figura 12 – Exemplo de <i>short-term</i> HRV de 5 min no repouso: (a) série temporal de intervalos NN para análise linear no domínio do tempo; (b) decomposição espectral da série em bandas de frequência por meio das técnicas de FFT e AR para análise linear no domínio da frequência; e (c) gráficos de flutuação de tendência e Poincaré para análise não-linear.	52

Figura 13 – Exemplo de <i>short-term</i> HRV de 5 min no repouso: (a) paciente saudável e (b) paciente DM2 positivo para CAN.	54
Figura 14 – Sistema trigêmeo: nervo trigêmeo, núcleos do trigêmeo no tronco encefálico e áreas de inervação.	59
Figura 15 – Tronco encefálico: via de entrada do nervo trigêmeo (V), núcleos do trigêmeo, núcleo do trato solitário (NTS), núcleo motor dorsal do vago e nervo vago (X). .	60
Figura 16 – Resumo do caminho neuronal para os reflexos do trigêmeo.	62
Figura 17 – Componentes e mecanismos envolvidos na evocação do reflexo de mergulho: estímulos, receptores, vias neuronais e repostas fisiológicas.	65
Figura 18 – Sala de atendimento para realização dos procedimentos clínicos: (a) vista anterior e (b) posterior.	80
Figura 19 – Esquema do protocolo experimental para coleta dos dados cardiovasculares.	83
Figura 20 – Equipamentos e materiais utilizados nos procedimentos experimentais: (a) equipamentos para as medições e coleta de dados, (b) materiais para execução do CFT e (c) materiais de apoio para preparação do procedimento experimental.	84
Figura 21 – Janela do software AFTscan versão 2018 3.3.3 com o ECG de 5 min no repouso do participante X.	85
Figura 22 – Sinal de ECG de 5 min do voluntário X no repouso reamostrado para 1 kHz e filtrado com Butterworth passa-faixa de 4ª ordem com frequências de corte em 0,5 Hz e 40 Hz.	89
Figura 23 – Processo de detecção dos picos das ondas R do sinal de ECG pelo método de Transformada <i>Wavelet</i> : (a) convolução do sinal de ECG com a derivada de 1ª ordem da gaussiana de escala 2^4 e (b) picos R detectados no ECG.	90
Figura 24 – Tratamento da série de intervalos RR extraída do sinal de ECG de 9 min do voluntário X: (a) a série de intervalos RR, (b) o processo de identificação e eliminação dos batimentos ectópicos e (c) a série de intervalos NN resultante.	91
Figura 25 – Formação das janelas de 170 s no software Kubios® HRV Standard versão 3.5.0: a série de intervalos NN extraída do ECG de 9 min do participante X e a separação das três janelas para análise da <i>ultra-short</i> HRV de 170 s no CFT.	92
Figura 26 – Fluxograma da seleção dos participantes e formação dos grupos do estudo.	96
Figura 27 – Descritivo dos (a) resultados dos CARTs e dos (b) valores dos índices da <i>short-term</i> HRV de 5 min no repouso.	98

Figura 28 – Séries temporais de FC no CFT: (a) paciente Y do grupo Controle e (b) paciente Z do grupo DMCAN+.....	102
Figura 29 – O efeito do DR na FC: métricas (a) FCm, (b) Δ FCm, (c) FCmin e (d) Δ FCmin ao longo do CFT.....	104
Figura 30 – Índices de <i>ultra-short</i> HRV de 170 s no CFT: alteração dos valores dos índices ao longo do CFT.....	109

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estruturas que formam o complexo excito-condutor do coração e suas funções. .31	
Quadro 2 – Funções autonômicas cardiovasculares.43	
Quadro 3 – Efeitos fisiológicos dos reflexos barorreceptor, paralelo de baixa pressão e quimiorreceptor.....44	
Quadro 4 – Testes de Reflexo Autonômico Cardiovasculares (CARTs) de acordo com Protocolo O’Brien.50	
Quadro 5 – Principais critérios diagnósticos de CAN com base no método de PC da bateria de CARTs.50	
Quadro 6 – Índices lineares e não-lineares da <i>short-term</i> HRV e os respectivos sistemas nervosos autônomos quantificados.55	
Quadro 7 – Períodos de tempo mínimo necessários capazes de estimar os valores dos índices de <i>short-term</i> HRV de 5 min no repouso com coeficiente de correlação de Pearson $\geq 0,9$ nos estudos de Shaffer et al. (2019).....57	
Quadro 8 – Os subtipos do reflexo trigêmeo-cardíaco.....64	
Quadro 9 – Configuração dos parâmetros no software Kubios® para análise da HRV.93	
Quadro 10 – Critérios laboratoriais para diagnóstico de normoglicemia, Pré-diabetes e Diabetes Mellitus.140	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado dos CARTs, índices da <i>short-term</i> HRV de 5 min no repouso e a formação dos grupos.	97
Tabela 2 – Dados clínicos e demográficos dos participantes.	99
Tabela 3 – Parâmetros do CFT: frequências cardíacas, latência da resposta, temperatura de estimulação e outros.	103
Tabela 4 – Correlação dos parâmetros do CFT com os dados clínicos e demográficos dos participantes.	105
Tabela 5 – Avaliação da confiabilidade dos índices de <i>ultra-short</i> HRV no repouso.	106
Tabela 6 – Índices de <i>ultra-short</i> HRV de 170 s no CFT: os grupos Controle, DMCAN– e DMCAN+ nas condições de repouso, sob efeito do DR e durante a recuperação, os efeitos principais e o efeito da interação.	108
Tabela 7 – Desempenho diagnóstico dos índices da <i>ultra-short</i> HRV de 170 s no CFT base na curva ROC.	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AV	Nó Atrioventricular
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BRS	<i>Baroreceptor Sensitivity</i>
Ca ²⁺	Íon de Calcio
CAN	<i>Cardiovascular Autonomic Neuropathy</i>
CART	<i>Cardiovascular Autonomic Reflex Test</i>
CFT	<i>Cold Face Test</i>
CO ₂	Gás Carbônico (dióxido de carbono)
DAN	<i>Diabetic Autonomic Neuropathy</i>
DC	Débito Cardíaco
DCV	Doença Cardiovascular
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DN	<i>Diabetic Neuropathies</i>
DR	<i>Diving Reflex</i>
DR40	<i>Diving Reflex</i> nos 40 primeiros segundos
ECG	Eletrocardiograma
FC	Frequência Cardíaca
FCb	Frequência Cardíaca Basal
FFT	<i>Fast Fourier Transform</i>
FR	Frequência Respiratória
GPAQ	<i>Global Physical Activity Questionnaire</i>
H ⁺	Íon de Hidrogênio
HbA1c	Hemoglobina glicada
HF	<i>High Frequency</i>
HRV	<i>Heart Rate Variability</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
I _f	Canais de Corrente <i>Funny</i>

K ⁺	Íon de Potássio
LF	<i>Low Frequency</i>
NA	Noradrenalina
Na ⁺	Íon de Sódio
NTS	Núcleo do Trato Solitário
O ₂	Oxigênio
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
Pco ₂	Pressão Parcial de Gás Carbônico
Po ₂	Pressão Parcial de Oxigênio
POP	Procedimento Operacional Padrão
PPG	<i>Photoplethysmography</i>
PSVT	<i>Paroxysmal Supraventricular Tachycardia</i>
REC	Recuperação
REP	Repouso
RPT	Resistência Periférica Total
SA	Nó Sinotrial
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SCV	Sistema Cardiovascular
SMSL	Síndrome de Morte Súbita do Lactente
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNP	Sistema Nervoso Parassimpático
SNS	Sistema Nervoso Simpático
TCR	<i>Trigeminocardiac Reflex</i>
ULF	<i>Ultra Low Frequency</i>
V1	Divisão Oftálmica do Nervo Trigêmeo
V2	Divisão Maxilar do Nervo Trigêmeo
V3	Divisão Mandibular do Nervo Trigêmeo
VLF	<i>Very Low Frequency</i>
VS	Volume Sistólico
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

s	Segundo	[tempo]
min	Minuto	[tempo]
hr	Hora	[tempo]
bpm	Batimentos por minuto	[frequência]
g	Gramma	[massa]
ml	Mililitro	[volume]
°C	Graus Célsius	[temperatura]
mmol/L	Milimol por litro	[concentração]
mg/dl	Miligrama por decilitro	[concentração]
ml/min	Mililitro por minuto	[vazão]
mmHg	Milímetros de mercúrio	[força por unidade de área]
pH	Potencial Hidrogeniônico	[nível de acidez e basicidade]

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA	15
1.1.1	Diabetes Mellitus (DM)	15
1.1.2	Neuropatias Diabéticas (DN)	16
1.1.3	Neuropatia Autonômica Cardiovascular (CAN)	17
1.1.4	Desafios na Avaliação e Limitações no Diagnóstico da CAN	19
1.1.5	Uma Breve Abordagem sobre o Reflexo de Mergulho (DR) e a CAN	22
1.2	JUSTIFICATIVA	24
1.3	OBJETIVOS	26
1.3.1	Objetivo Geral	26
1.3.2	Objetivos Específicos	26
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1	SISTEMA CARDIOVASCULAR (SCV)	27
2.1.1	Coração, Vasos Sanguíneos e Dinâmica Cardiovascular	27
2.1.2	Métricas da Fisiologia Cardiovascular	32
2.1.3	Eletrocardiograma (ECG)	35
2.2	INTERAÇÃO NEURO-CARDIOGÊNICA E NEURO-VASCULAR.....	38
2.2.1	Sistema Nervoso Autônomo (SNA)	38
2.2.2	Funções Autonômicas Cardiovasculares	39
2.2.3	Manutenção da Pressão Arterial	44
2.2.3.1	<i>Reflexo Barorreceptor</i>	44
2.2.3.2	<i>Reflexo Paralelo de Baixa Pressão</i>	45
2.2.3.3	<i>Reflexo Quimiorreceptor</i>	46
2.3	AVALIAÇÃO DE FUNÇÕES AUTONÔMICAS CARDIOVASCULARES E CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DA CAN.....	47
2.3.1	Testes de Reflexo Autonômico Cardiovasculares (CARTs)	48

2.3.2	Variabilidade da Frequência Cardíaca (HRV)	51
2.3.2.1	<i>A Short-term HRV sob efeito de perturbações fisiológicas</i>	56
2.3.2.2	<i>A Ultra-short HRV no repouso</i>	56
2.4	SISTEMA TRIGÊMEO – NERVO TRIGÊMEO E TRONCO ENCEFÁLICO.....	58
2.4.1	Reflexos do Trígêmeo – O Reflexo Trigêmino-cardíaco (TCR)	62
2.5	REFLEXO DE MERGULHO (DR)	64
2.5.1	A Relação do DR e do TCR.....	69
2.5.2	Testes de Funções Autonômicas com base no DR – <i>Cold Face Test</i> (CFT)	69
2.5.3	Outras Utilidades do DR na Clínica e na Pesquisa Científica	73
2.5.4	Fisiopatologia relacionada ao DR.....	74
3	MATERIAIS E MÉTODOS	76
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	76
3.2	LOCAL DO ESTUDO.....	76
3.3	ASPECTOS ÉTICOS.....	77
3.4	SEGURANÇA EM PESQUISA DURANTE A PANDEMIA DO SARS-CoV-2..	77
3.5	POPULAÇÃO.....	78
3.5.1	Critérios de Inclusão.....	78
3.5.2	Critérios de Exclusão.....	79
3.6	PROCEDIMENTOS CLÍNICOS E COLETA DE DADOS	80
3.6.1	Avaliação Inicial – Identificação, Anamnese e Exame Antropométrico.....	81
3.6.2	Questionário Global de Atividade Física (GPAQ).....	81
3.6.3	Procedimento Experimental para Coleta dos Dados Cardiovasculares	82
3.6.3.1	<i>Protocolo Experimental</i>	82
3.6.3.2	<i>Materiais e Equipamentos</i>	83
3.6.3.3	<i>Diagnóstico de CAN – Fase 1.....</i>	86
3.6.3.4	<i>Métricas Investigativas de Interesse – Fase 2</i>	86
3.7	PROCESSAMENTO DOS SINAIS	88

3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	93
4	RESULTADOS	96
4.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS.....	99
4.2	AVALIAÇÃO DO CFT E DO REFLEXO DE MERGULHO (DR)	101
4.2.1	Correlação com os Dados Clínicos e Demográficos	105
4.3	<i>ULTRA-SHORT</i> HRV NO CFT	106
4.3.1	Avaliação da Confiabilidade e Seleção dos Índices.....	106
4.3.2	Análise Discriminante via ANOVA Mista	107
4.3.3	Desempenho Diagnóstico	111
5	DISCUSSÃO.....	113
5.1	PREVALÊNCIA DE CAN NOS PARTICIPANTES	113
5.2	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS.....	114
5.3	AVALIAÇÃO DO CFT E DO REFLEXO DE MERGULHO (DR)	115
5.4	<i>ULTRA-SHORT</i> HRV NO CFT	120
5.5	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	123
6	CONCLUSÕES	125
6.1	TRABALHOS FUTUROS	126
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128
	APÊNDICE A – Testes e Critérios para Diagnóstico do Diabetes Mellitus ...	140
	APÊNDICE B – Formulário de Avaliação Inicial	141
	APÊNDICE C – Análise Individual e Comparativa das Curvas ROC dos Índices Seleccionados da <i>Ultra-short</i> HRV no CFT para detecção da CAN	143
	ANEXO A – Parecer Consubstanciado CAAE 43349021.1.0000.0121 da CEPESH/UFSC.....	146
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	146
	ANEXO C – Global Physical Activity Questionnaire (GPAQ)	146
	ANEXO D – POP Testes de Referência	146
	ANEXO E – POP DR-CFT	146

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA

1.1.1 Diabetes Mellitus (DM)

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica e progressiva caracterizada pela insuficiência ou ineficiência de insulina no organismo – hormônio pancreático que controla a entrada de glicose nas células (ALBERTI; ZIMMET, 1998).

Clinicamente, destacam-se dois tipos mais prevalentes da doença: o Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) e o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) – 90% da população DM é do tipo DM2 (IDF, 2019; WHO, 2019). O DM1 caracteriza-se como uma reação autoimune que destrói células β -pancreáticas (responsáveis pela síntese de insulina); como resultado, ocorre absoluta ausência ou insuficiente produção do hormônio. Sua incidência está relacionada a fatores genéticos e o início dos sintomas ocorre majoritariamente na infância ou início da fase adulta. Já o DM2 se caracteriza pela produção inadequada de insulina e/ou resistência periférica ao hormônio – incapacidade de as membranas celulares responderem à ação da insulina, o que impossibilita a entrada de glicose nas células. O pico de incidência do DM2 é a fase adulta acima dos 40 anos de idade, e os principais fatores de risco são sedentarismo, obesidade, tabagismo, alcoolismo, estresse e idade avançada (ADA, 2020; ALBERTI; ZIMMET, 1998; IDF, 2019; WHO, 2019).

Como a insulina é responsável por regular a taxa de glicose no sangue (*i.e.*, glicemia), sua deficiência resulta em acúmulo de glicose na corrente sanguínea (*i.e.*, hiperglicemia), sendo esta, a principal característica do DM (ALBERTI; ZIMMET, 1998). A hiperglicemia causa diversos danos a nível microvascular (RAMASAMY et al., 2005), por isso, pessoas com DM devem fazer uso contínuo de medicamentos para controle do nível glicêmico. Com o passar do tempo, entretanto, a somatória de falhas microvasculares decorrentes da hiperglicemia começa a causar lesões teciduais irreversíveis, podendo gerar disfunção de nervos (*i.e.*, neuropatias), disfunção dos rins (*i.e.*, nefropatia), danos oculares (*i.e.*, retinopatia e perda visual) e ainda contribuir para a incidência de doenças cardiovasculares, gerando complicações limitantes, incapacitantes ou até mesmo de risco à vida (ADA, 2020; IDF, 2019; WHO, 2019).

Dentre as complicações de longo prazo, as neuropatias são as mais prevalentes no DM, afetando cerca de metade dos pacientes DM (PATEL; HORAK; TIRYAKI, 2020; POP-BUSUI et al., 2017a; TESFAYE et al., 2010).

1.1.2 Neuropatias Diabéticas (DN)

Neuropatia é o termo usado para designar danos ou disfunções de células nervosas que culminam no mau funcionamento de alguma parte do sistema nervoso – seja central ou periférico, somático ou autonômico (RUDY, 1945). Diversos fatores contribuem para a incidência das neuropatias; porém, a hiperglicemia é considerada a principal entre as etiologias da doença (RAMASAMY et al., 2005): o excesso de glicose no sangue aciona uma cascata de mecanismos que induzem a produção de substâncias tóxicas de caráter oxidativo aos capilares sanguíneos, e estes, incapacitados de irrigar os nervos, resultam em disfunção e morte neuronal. Por esse motivo, as neuropatias são tão comuns no DM, conhecidas como neuropatias diabéticas (DN – *Diabetic Neuropathies*) (BOULTON et al., 2005).

As DN caracterizam-se por uma larga heterogeneidade de condições, incluindo diferentes padrões de envolvimento neurológico, tempo de progressão e de comprometimento de mecanismos patológicos, resultando em um amplo espectro de manifestações clínicas (POP-BUSUI et al., 2017a; TESFAYE et al., 2010). Dentre os variados tipos, as chamadas neuropatias autonômicas diabéticas (DAN – *Diabetic Autonomic Neuropathies*) se caracterizam pela disfunção de neurônios que compõem o sistema nervoso autonômico – simpático, parassimpático ou ambos –, comprometendo fibras vasomotoras e visceromotoras de forma difusa e generalizada (VINIK et al., 2003).

Como todos os órgãos internos e a pele são inervados por tais fibras, as DAN causam uma variedade de desregulações (cardiovasculares, gastrointestinais, geniturinários, oculares e sudomotores) (POP-BUSUI et al., 2017a; VINIK et al., 2003). Um estudo longitudinal mostrou que tais disfunções podem se iniciar ainda no primeiro ano de diagnóstico do DM2 e em até dois anos do DM1, porém, de forma assintomática (*i.e.*, subclínica) (PFEIFER et al., 1984). Os primeiros sintomas geralmente não se manifestam se não vários anos após a incidência do DM, quando as DAN já estão em estágio mais avançado e os pacientes começam a sentir desconforto na realização de atividades simples do dia a dia (VINIK et al., 2003).

Estudos clínicos revelam que os primeiros sintomas mais evidentes de DAN são comumente observados em exames cardíacos; por isso, acredita-se que o sistema cardiovascular seja o mais impactado (YUN et al., 2018). Além de ser a forma mais comum de DAN, a chamada neuropatia autonômica cardiovascular tem cada vez mais se mostrado preditora independente de mortalidade no DM (POP-BUSUI et al., 2017a; SPALLONE et al., 2011b; VINIK et al., 2018), por isto, requerido atenção e cuidado especiais.

1.1.3 Neuropatia Autonômica Cardiovascular (CAN)

A neuropatia autonômica cardiovascular (CAN – *Cardiovascular Autonomic Neuropathy*) caracteriza-se por disfunções de fibras autonômicas que inervam o coração e os vasos sanguíneos, resultando em anormalidades no controle cardíaco e na dinâmica vascular (SCHUMER; JOYNER; PFEIFER, 1998; VINIK; ZIEGLER, 2007). As principais manifestações da CAN incluem: variabilidade reduzida da frequência cardíaca, frequência cardíaca basal aumentada (*i.e.*, taquicardia em repouso), hipotensão ortostática e intolerância a realização de exercícios físicos (FISHER; TAHRANI, 2017; POP-BUSUI et al., 2017a; SPALLONE et al., 2011b; VINIK; ZIEGLER, 2007). Angina não dolorosa e hipertensão noturna também são reportados em alguns casos (PATEL; HORAK; TIRYAKI, 2020).

Estudos sugerem que o processo de disfunção neuronal se inicia distalmente e progride proximalmente (BALCIOĞLU; MÜDERRISOĞLU, 2015). Como o nervo vago é o mais longo e responsável por aproximadamente 75% de toda a atividade parassimpática, acredita-se que o tônus vagal tende a ser o primeiro impactado nas DAN (VINIK et al., 2003) – o que explica a redução da variabilidade da frequência cardíaca como uma das primeiras manifestação da CAN (FISHER; TAHRANI, 2017; VINIK; ZIEGLER, 2007). Com o tempo, a disfunção vagal se torna tão intensa a ponto de pessoas com CAN apresentarem taquicardia em repouso superior a 100 bpm (VINIK et al., 2018) – 60-70 bpm é a frequência basal característica de adultos saudáveis (SILVERTHORN, 2017).

Seguindo o raciocínio anterior, a hipotensão ortostática – déficit simpático – tende a ser uma das manifestações mais tardias na CAN. Ela é resultante de falha inotrópica (fraca contração do miocárdio) combinada à falha de manutenção contrátil dos vasos sanguíneos após mudança brusca de postura (de deitado para em pé, por exemplo), causando tontura, fraqueza, náusea, visão escurecida ou até mesmo síncope. Por sua vez, a intolerância a exercícios físicos é decorrente de débito cardíaco insuficiente (falha inotrópica somada à baixa variabilidade da frequência cardíaca), comumente relatada como fadiga, falta de ar ou início de síncope (FISHER; TAHRANI, 2017; POP-BUSUI et al., 2017a; SPALLONE et al., 2011b; VINIK; ZIEGLER, 2007).

Além das manifestações clínicas apresentadas, a CAN tem se mostrado fator de risco para progressão de diversas comorbidades, bem como preditora independente de mortalidade no DM (FISHER; TAHRANI, 2017; POP-BUSUI et al., 2017a; SPALLONE et al., 2011b; VINIK et al., 2018; YUN et al., 2018). As principais comorbidades incluem: doenças

cardiovasculares (DCV), retinopatia diabética, nefropatia diabética, e doenças renais crônicas. Entre as DCVs, destacam-se: hipertensão, arritmias cardíacas, insuficiência cardíaca, isquemia silenciosa do miocárdio e acidente vascular cerebral (AVC) (AGASHE; PETAK, 2018; BALCIOĞLU; MÜDERRISOĞLU, 2015; BISSINGER, 2017; DYCK et al., 1993; FISHER; TAHRANI, 2017; PATEL; HORAK; TIRYAKI, 2020; POP-BUSUI et al., 2017a, 2017b; SPALLONE et al., 2011b; TESFAYE et al., 2010; VALENSI et al., 2003; VINIK et al., 2018; VINIK; ERBAS; CASELLINI, 2013; VINIK; ZIEGLER, 2007; WITTE et al., 2005; YUN et al., 2018).

Uma análise *post hoc* (LONN et al., 2014) de dois grandes estudos coortes (ONTARGET e TRANSCEND) (2001-2006) que ao todo incluíram 31.531 pacientes com alguma DCV crônica estável (portadores ou não de DM) revelou que a frequência cardíaca basal – uma medida indireta para monitoramento da CAN (*i.e.*, taquicardia em repouso) – foi o marcador que ao longo do estudo mais se correlacionou a aumentos expressivos no (1) número de eventos cardiovasculares provocados por DCV, (2) número de mortes causadas por DCV e (3) número de mortes por todas as causas. O *post hoc* (POP-BUSUI et al., 2017b) de outro coorte (DCCT/EDIC) (1983–1989), contendo dessa vez apenas pacientes DM1 (n = 1.441), sustentou a evidência anterior ao relatar que a taxa de eventos cardiovasculares provocados por DCV foi 2,79 ([1,91–4,09], 95% IC, p < 0,001) vezes maior no grupo CAN quando comparado ao grupo sem CAN, enquanto que um terceiro coorte (EURODIAB-PCS) (até 1999) mostrara que a CAN elevou o risco de morte em 2,40 ([1,32–4,36], 95% IC) vezes também na população DM1 (n = 2.787) (SOEDAMAH-MUTHU et al., 2008). Por fim, um estudo (ACCORD) contendo apenas pacientes DM2 (n = 8.135) mostrou que a taxa de mortalidade por DCV e a taxa de mortalidade por todas as causas foram até 2,95 ([1,33–6,53], 95% IC, p = 0,008) e até 2,14 ([1,14–3,76], 95% IC, p < 0,001) vezes maiores, respectivamente, no grupo CAN quando comparado ao grupo sem CAN (POP-BUSUI et al., 2010).

Em termos de tratamento, ainda não há nenhuma terapia capaz de reverter as disfunções quando já estabelecidas (FISHER; TAHRANI, 2017; POP-BUSUI et al., 2017a); por isso, o tratamento da CAN é focado no controle dos sintomas e no retardamento de sua progressão. O incentivo a prática regular de atividade física, a reposição de água e de sais minerais e administração de drogas antioxidantes (como ácido α -lipóico e vitamina E) estão entre as principais medidas relatadas na literatura (FISHER; TAHRANI, 2017; POP-BUSUI et al., 2017a; VINIK et al., 2018).

1.1.4 Desafios na Avaliação e Limitações no Diagnóstico da CAN

Em termos de prevalência, os números da CAN variam muito. De acordo com uma revisão ainda recente (FISHER; TAHRANI, 2017), a prevalência de CAN tem variado de 17% a 66% no DM1 e de 31% a 73% no DM2. Tal variação é parcialmente explicada pelo uso de diferentes métodos de avaliação, diferentes critérios diagnósticos e diferentes critérios de seleção das populações, como a idade, a duração do DM e a presença de comorbidades e complicações. Em geral, os estudos indicam prevalência de CAN maior no DM2 em comparação com o DM1 (apesar da maior duração do DM em pacientes DM1); isso é provavelmente relacionado ao fato de pacientes DM2 terem idade mais avançada e serem mais propensos a risco de DCV (FISHER; TAHRANI, 2017).

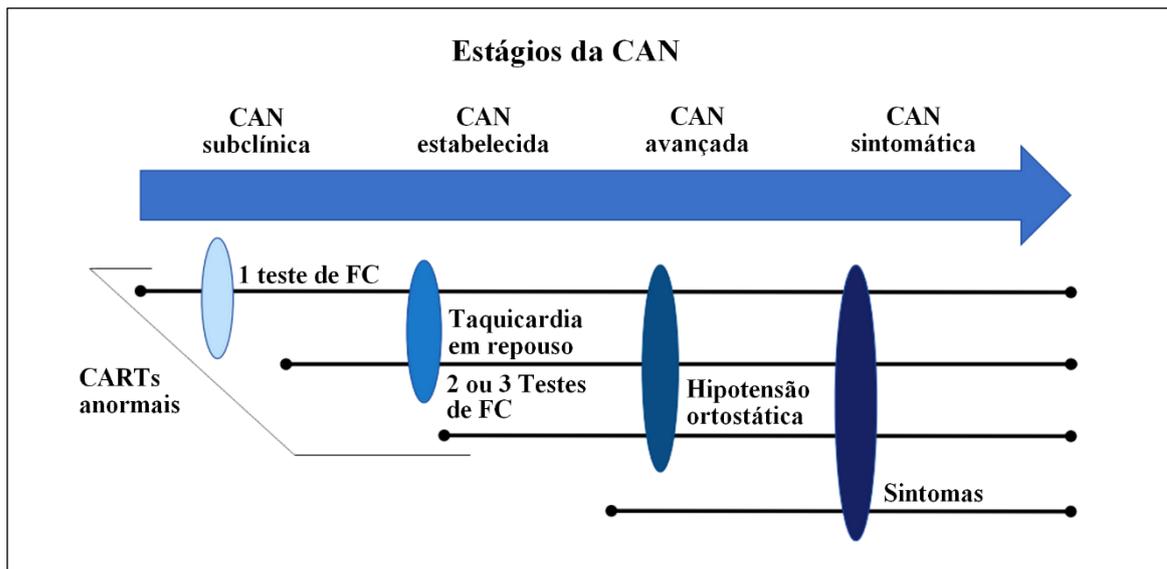
Estudos longitudinais indicaram ainda um aumento anual de 6% na prevalência de CAN no DM2 e de cerca de 2% no DM1 (POP-BUSUI et al., 2009; SPALLONE et al., 2011b; THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH, 1998), contudo, o acompanhamento médico e a reavaliação anual são muitas vezes negligenciados pelos pacientes. Por este motivo, a CAN é considerada por muitos autores como a complicação mais subdiagnosticada no DM (BALCIOĞLU; MÜDERRISOĞLU, 2015; FISHER; TAHRANI, 2017; SPALLONE et al., 2011b).

Os métodos padrão-ouro para a avaliação da CAN são os chamados testes de reflexo autonômico cardiovasculares (CARTs – *Cardiovascular Autonomic Reflex Test*), reconhecidos e recomendados pela (1) *American Diabetes Association* (POP-BUSUI et al., 2017a), pelo (2) *Toronto Consensus Panel* (BERNARDI et al., 2011; SPALLONE et al., 2011b), pela (3) *Italian Society of Diabetology* (SPALLONE et al., 2011a) e pela (4) Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2020). Os CARTs consistem em manobras simples que permitem avaliar as funções autonômicas cardiovasculares por meio do monitoramento do comportamento da frequência cardíaca e da pressão arterial (EWING; CAMPBELL; CLARKE, 1980). As manobras incluem respiração profunda, manobra de Valsalva e mudança ortostática. A variação da frequência cardíaca é analisada em cada uma das três manobras e a variação da pressão arterial é avaliada na última (BERNARDI et al., 2011; EWING; CAMPBELL; CLARKE, 1980; O'BRIEN; CORRALL, 1985; SPALLONE et al., 2011a, 2011b; VINIK et al., 2018).

Embora os CARTs sejam os testes mais recomendados, existe certa disparidade na literatura quanto aos critérios adotados para o diagnóstico da CAN (BHATI; HUSSAIN, 2020; SPALLONE et al., 2011b). O critério mais comumente utilizado é o de Ewing, o primeiro

pesquisador a propor a metodologia dos CARTs. Ele se baseia na concepção teórica de que a disfunção parassimpática precede a disfunção simpática na CAN, por isso, classifica os pacientes em CAN subclínica (precoce) e CAN estabelecida de acordo apenas com os resultados dos testes de frequência cardíaca (reflexo parassimpático) e classifica em CAN avançada (grave) os pacientes com hipotensão ortostática (reflexo simpático) (POP-BUSUI et al., 2017a; SPALLONE et al., 2011a). A Figura 1 ilustra os critérios diagnósticos de Ewing.

Figura 1 – Classificação da CAN proposta por Ewing com base nos resultados anormais dos CARTs.



Fonte: Adaptado de Vinik et al. (2013, p. 13) e Fisher et al. (2017, p. 425).

CAN: *cardiovascular autonomic neuropathy*; CARTs: *cardiovascular autonomic reflex tests*; FC: frequência cardíaca.

Uma problemática quanto à metodologia dos CARTs é que eles exigem a participação ativa dos pacientes: algumas pessoas podem apresentar limitações físicas, cognitivas ou até mesmo psicológicas e não conseguem realizar as manobras de maneira correta, o que compromete os critérios de avaliação. Por exemplo: (1) Não encher e esvaziar totalmente os pulmões na manobra de respiração profunda, (2) não focalizar devidamente o aumento da pressão intratorácica durante a execução da manobra Valsava ou ainda (3) não conseguir se levantar prontamente na manobra de mudança ortostática – sendo esta extremamente importante pois é a única manobra que permite avaliar a função simpática (hipotensão ortostática) – limita a avaliação e o diagnóstico da CAN pelos CARTs. As principais causas de incapacidade dos pacientes são: obesidade, idade avançada, amputação de membro, úlcera e lesão nas pernas e/ou coluna (ROLIM; DE SOUZA; DIB, 2013; SPALLONE et al., 2011b; VINIK et al., 2018).

Um segundo fator impactante é a presença de glaucoma e/ou retinopatia diabética. Glaucoma é uma doença ocular causada por aumento da pressão intraocular que provoca lesões e comprometimento visual (RAFUSE et al., 1994), e a retinopatia diabética é caracterizada por danos microvasculares que comprometem a vascularização da retina e prejudicam a visão (BLANKENSHIP, 1981). Como o mecanismo da manobra de Valsalva é caracterizado por um rápido aumento da pressão intratorácica e intra-abdominal – e consequente aumento da pressão intravenosa nos olhos (LOOGA, 2005; SUN et al., 2020) –, a Associação Americana de Diabetes (ADA – *American Diabetes Association*) e demais entidades responsáveis recomendam que pacientes diagnosticados com glaucoma e/ou retinopatia diabética não executem a manobra de Valsalva (EWING et al., 1985; SPALLONE et al., 2011a, 2011b; TESFAYE et al., 2010). Vale ainda lembrar que a retinopatia diabética é apontada como preditora da CAN em diversos estudos, ou seja, também presente na maioria dos pacientes com CAN (AGASHE; PETAK, 2018; BALCIOĞLU; MÜDERRISOĞLU, 2015; BISSINGER, 2017; DYCK et al., 1993; PATEL; HORAK; TIRYAKI, 2020; SPALLONE et al., 2011b; TESFAYE et al., 2010; VALENSI et al., 2003; VINIK; ZIEGLER, 2007; WITTE et al., 2005).

Diante dessas e de outras situações, a *American Diabetes Association* (POP-BUSUI et al., 2017a), o *Toronto Consensus Panel* (BERNARDI et al., 2011; SPALLONE et al., 2011b), a *Italian Society of Diabetology* (SPALLONE et al., 2011a) e a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2020) recomendam a inclusão de métodos investigativos complementares aos CARTs para avaliação mais exata e precisa da CAN. Os métodos recomendados são: (1) análise de índices de variabilidade da frequência cardíaca (HRV - *Heart Rate Variability*) no domínio do tempo e no domínio da frequência; (2) análise do índice de sensibilidade barorreflexa (BRS – *Baroreflex Sensibility*) e monitoramento contínuo da pressão arterial; e (3) análise do intervalo QT do sinal de eletrocardiografia.

Dentre os métodos complementares, a HRV vem se destacando na literatura, mostrando-se muito efetiva na detecção da CAN. A maior parte dos estudos utiliza a metodologia de HRV em condições basais, *i.e.*, as medidas são feitas com o paciente deitado e em repouso (CHEN et al., 2008; CHESSA et al., 2002; FAUST et al., 2012; FRANÇA DA SILVA et al., 2016; LIN et al., 2017; METELKA et al., 2018; TANG et al., 2014; TANK et al., 2001; ZIEMSEN; SIEPMANN, 2019); poucos trabalhos exploram a HRV sob efeito de perturbações fisiológicas, *i.e.*, em condições de esforço ou durante a recuperação pós-exercício (BHATI et al., 2019; METELKA et al., 2018).

A HRV em repouso é amplamente utilizada devido à facilidade de executar a coleta de dados, evitando possíveis questões de limitação física (como exemplificado anteriormente) e minimizando a presença de ruídos e artefatos de movimento (SHAFFER; GINSBERG, 2017). Por outro lado, a HRV em condição de repouso reflete apenas as informações autonômicas basais do paciente, *i.e.*, ela não quantifica o controle dinâmico exercido pelo sistema nervoso sobre o sistema cardiovascular, podendo fornecer dados incompletos sobre as funções autonômicas (BHATI et al., 2019). Evidências científicas sugerem que o sistema nervoso autonômico é mais responsivo durante perturbações fisiológicas (MICHAEL; GRAHAM; OAM, 2017); portanto, avaliações dinâmicas poderiam resultar em diagnóstico de CAN com acurácia maior.

Com base nesse argumento, Metelka et al. (2018) realizaram um estudo dinâmico de HRV onde submeteram pacientes DM2 a um teste de se levantar e deitar para impor perturbações fisiológicas. Segundo os autores, a carga autonômica resultou em mudanças significativas na potência espectral da HRV. Em um segundo teste, os autores controlaram a frequência respiratória dos participantes e, como resultado, foi observado aumento da potência espectral de alta frequência (reflexo da atividade parassimpática). Em um outro estudo, Bhati et al. (2019) compararam a HRV no repouso à HRV em condição pós-exercício ergométrico e, segundo os autores, a HRV apresentou indicadores diagnósticos de CAN com acurácia significativamente maior no pós-exercício ($p \leq 0,03$).

1.1.5 Uma Breve Abordagem sobre o Reflexo de Mergulho (DR) e a CAN

O reflexo de mergulho (DR - *Diving Reflex*) é uma ação protetiva multissistêmica coordenada pelo tronco encefálico que ocorre em resposta à submersão da face em água (HARDING; ROMAN; WHELAN, 1965). Quando uma pessoa mergulha em água fria, o rosto e o nariz molham e se esfriam, estimulando receptores do nervo trigêmeo localizadas na pele da face e na mucosa nasal. Como resultado, ocorre co-ativação parassimpática e simpática observado pela (1) diminuição da frequência cardíaca (*i.e.*, bradicardia), (2) aumento da vasoconstrição periférica (*i.e.*, elevação da resistência vascular periférica) e (3) diminuição da frequência respiratória (*i.e.*, apneia) (CHOATE et al., 2014; FOSTER; SHEEL, 2005; GODEK; FREEMAN, 2019; GOODEN, 1994; LEMAITRE; SCHALLER, 2015; MEUWLY et al., 2015, 2017a, 2017b).

Uma busca literária feita nos *search engine* Google Scholar, Web of Science, Scopus e PubMed com acesso a diversas bases de dados resultou em 1 (um único) trabalho envolvendo o DR e a CAN no DM (ARIZA; BURGOS; FRATI, 1995). De acordo com o resumo, Ariza e colegas avaliaram o DR como possível teste diagnóstico de CAN ao comparar 15 pacientes DM com diagnóstico positivo prévio de CAN a 15 indivíduos saudáveis. Segundo os autores, a sensibilidade do teste DR foi maior que a dos CARTs ($p < 0,025$). A publicação do trabalho, entretanto, não foi encontrada. Pouca ou nenhuma informação é dada quanto à metodologia experimental empregada, quanto às métricas utilizadas, quanto aos critérios de avaliação e diagnóstico adotados e quanto às características da população estudada (como o tempo e o tipo do DM, a idade dos pacientes, a presença de outras comorbidades etc.) o que inviabiliza a reprodução do estudo e limita a confiabilidade das evidências científicas relatadas.

Devido ao forte efeito regulador sobre o sistema cardiovascular e com base na alta taxa de sensibilidade reportada por Ariza e colegas (1995), o DR aparenta ser um recurso com grande potencial para avaliação dinâmica das funções autonômicas cardiovasculares e detecção de CAN, para isto, entretanto, necessita de uma metodologia reproduzível e mais conceitualmente suportada pela literatura.

1.2 JUSTIFICATIVA

Diante do que foi apresentado, o presente estudo se justifica por:

- o DM é uma das emergências de saúde global que mais crescem no século XXI (WHO, 2019); estima-se que meio bilhão de pessoas entre 20 e 79 anos de idade vivem hoje com DM (9,3% da população mundial), um aumento de quase 200% em vinte anos – 171 milhões de casos estimados em 2000 (WILD et al., 2004); e projeções recentes apontam para 578 milhões em 2030 e 700 milhões em 2045 (IDF, 2019);
- no Brasil, a prevalência do DM saltou de 3,6% em 1990 para 6,1% em 2015 (DUNCAN et al., 2017), e, atualmente o país ocupa a 5ª posição no ranking mundial da doença, com 17 milhões de brasileiros com diabetes entre 20 e 79 anos de idade, e o 3º lugar no ranking mundial de DM infantil, com mais de 50 mil crianças com diabetes entre 0 e 14 anos (IDF, 2019);
- as DN são as complicações crônicas mais prevalentes no DM, sendo a CAN fator de risco para progressão de DCVs, de outras comorbidades associadas, eventos cardiovasculares maiores e ainda preditora independente de mortalidade no DM (FISHER; TAHRANI, 2017; POP-BUSUI et al., 2017a; SPALLONE et al., 2011b; VINIK et al., 2018);
- embora fator de risco para diversas comorbidades e preditora de mortalidade no DM, a CAN é também a complicação mais subdiagnosticada (BALCIOĞLU; MÜDERRISOĞLU, 2015; FISHER; TAHRANI, 2017; SPALLONE et al., 2011b); uma vez detectada, entretanto, é possível adotar medidas para retardar sua progressão e ainda estratificar o grau de risco cardiovascular do paciente, permitindo reduzir a frequência de eventos cardiovasculares maiores;
- a CAN é mais prevalente no DM2 que no DM1, e cerca de 90% da população mundial com diabetes corresponde ao tipo DM2 (IDF, 2019; WHO, 2019).
- A metodologia diagnóstica dos CARTs apresenta algumas limitações, como a necessidade de participação ativa do paciente e a ausência de glaucoma e de retinopatia diabética, dando margem a vieses importantes no diagnóstico de CAN;
- a metodologia da HRV no repouso tem sido amplamente aplicada para avaliação complementar da CAN; contudo, evidências científicas têm sugerido que a HRV

sob efeito de perturbações fisiológicas apresenta indicadores diagnósticos de CAN superiores; porém, sua metodologia ainda é pouco explorada na literatura;

- o DR é capaz de impor carga autonômica e aparenta potencial para ser usado como manobra de avaliação de funções autonômicas cardiovasculares e possível indicador diagnóstico de CAN, para isto, entretanto, necessita ser estudado e explorado mais a fundo; e
- Até onde sabemos, até o momento, nenhum estudo avaliou a utilidade clínica da HRV sob efeito do DR ou durante a recuperação do DR no diagnóstico de CAN.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo estudar a utilidade clínica do Reflexo de Mergulho na avaliação de funções autonômicas cardiovasculares e analisar o desempenho diagnóstico da *ultra-short Heart Rate Variability* sob efeito do reflexo na detecção da neuropatia autonômica cardiovascular no Diabetes Mellitus Tipo 2.

1.3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos são:

- realizar uma revisão da literatura sobre a etiologia, a prevalência e o prognóstico da CAN no DM, bem como os métodos diagnósticos e tratamentos relacionados;
- realizar uma revisão da literatura sobre a fisiologia do sistema cardiovascular, sobre o controle autonômico cardiovascular e os mecanismos do sistema trigêmeo;
- realizar uma revisão da literatura sobre os componentes e mecanismos envolvidos na evocação do DR, os métodos de aplicação e as respostas fisiológicas promovidas;
- desenvolver um procedimento operacional padrão para evocação do DR e coleta de dados cardiovasculares;
- realizar um estudo prático de caráter preliminar em amostras da população DM2 com diagnóstico positivo e negativo para CAN, tendo como referência amostras da população saudável (negativos para DM e CAN);
- correlacionar os dados clínicos e demográficos aos achados experimentais;
- analisar índices lineares e não-lineares de HRV em condições de repouso, sob efeito do DR e durante a recuperação, bem como outras variáveis relacionadas;
- avaliar o desempenho diagnóstico da *ultra-short* HRV no repouso, da *ultra-short* HRV sob efeito do DR e da *ultra-short* HRV durante a recuperação.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 SISTEMA CARDIOVASCULAR (SCV)

2.1.1 Coração, Vasos Sanguíneos e Dinâmica Cardiovascular

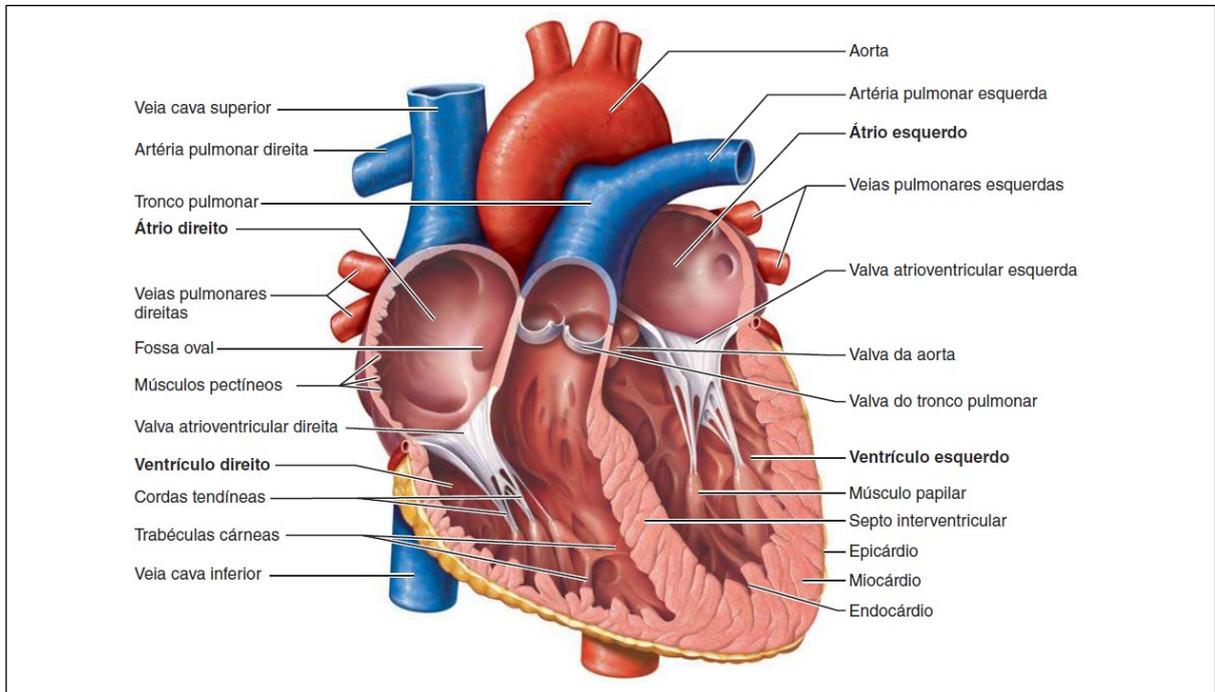
O sistema cardiovascular (SCV) é o sistema do corpo humano formado pelo coração e por uma rede de vasos sanguíneos conectados a ele cujo objetivo é conduzir o sangue em circuito fechado para todo o organismo, entregando oxigênio, nutrientes, hormônios e calor e removendo resíduos do metabolismo e o excesso de calor, visando a homeostase do corpo – constante equilíbrio do organismo. (GUYTON; HALL, 2011; KOEPPEN; STANTON, 2009).

O coração é a unidade central do SCV; um órgão oco equivalente a 0,5% de toda massa corporal composto principalmente por musculatura estriada cardíaca (*i.e.*, miocárdio) e tecido conjuntivo (KOEPPEN; STANTON, 2009). Sua função é exercer pressão sobre o volume de sangue carregado em suas câmaras, expulsando esse sangue e gerando fluxo pulsante unidirecional dentro do sistema vascular; por isso, o coração é comparado a uma bomba – ou melhor – a um par de bombas (GUYTON; HALL, 2011; SILVERTHORN, 2017).

Anatomicamente, o coração é dividido em quatro grandes câmaras: dois átrios na região superior e dois ventrículos na região inferior. A Figura 2 ilustra as estruturas internas do coração. Cada par átrio-ventrículo constitui uma bomba cardíaca distinta. A bomba cardíaca direita é responsável por bombear sangue para e de volta dos pulmões (circulação pulmonar), enquanto a bomba cardíaca esquerda – de maior espessura miocárdia (força) – é responsável por bombear sangue para e de volta de todas as demais partes do corpo (circulação sistêmica) (MARIEB; WIHELM; MALLATT, 2014).

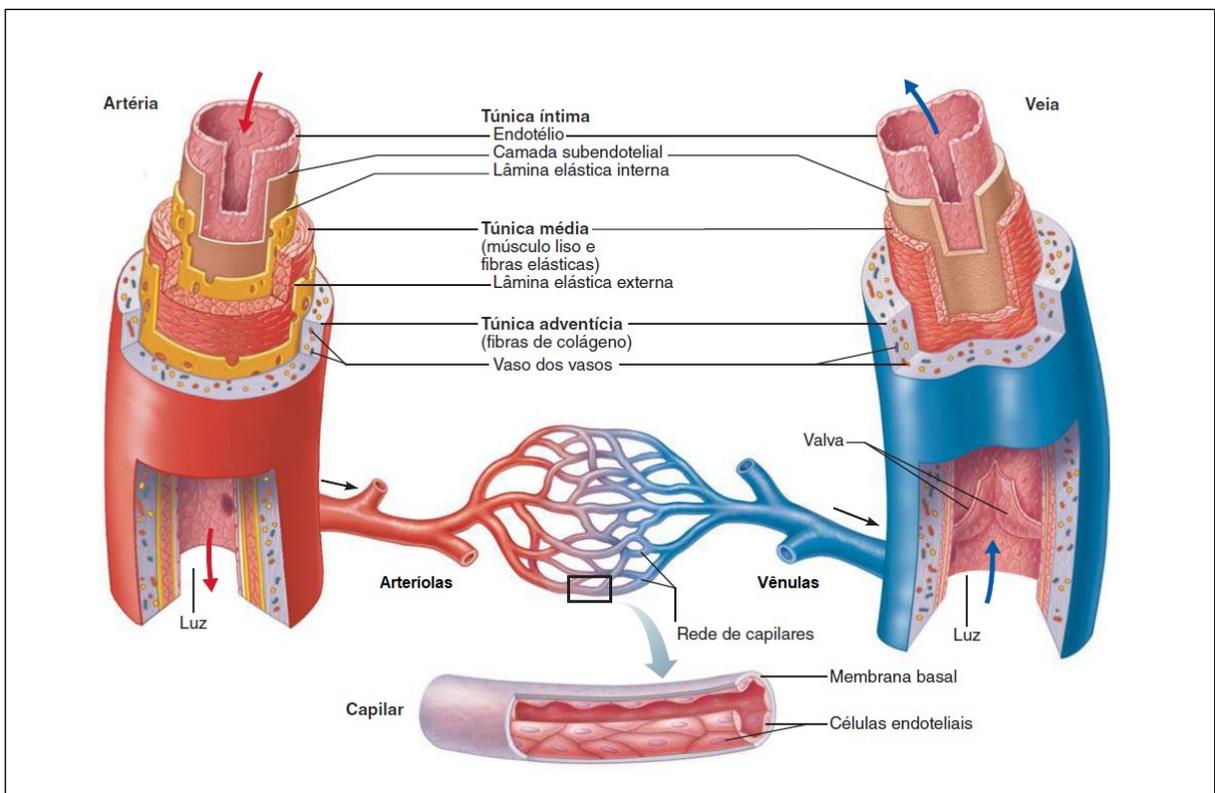
Os vasos sanguíneos constituem a parte vascular do SCV; uma rede de tubos ocos compostos por musculatura lisa, fibras elásticas e tecido endotelial em diferentes proporções, agregando a eles diferentes características e funções (MARIEB; WIHELM; MALLATT, 2014). A Figura 3 ilustra a anatomia dos vasos sanguíneos. Os vasos arteriais (artérias e arteríolas) são responsáveis por receber sangue do coração em alta pressão e conduzi-lo a todo o organismo. Os capilares sanguíneos são os locais de microcirculação onde ocorre troca gasosa entre o sangue e as células, bem como entrega de nutrientes e captação de resíduos do metabolismo. Por fim, os vasos venosos (veias e vênulas) são responsáveis por coletar e conduzir o sangue em menor pressão de volta ao coração (KOEPPEN; STANTON, 2009; SILVERTHORN, 2017).

Figura 2 – Anatomia interna do coração em visão frontal: os átrios, os ventrículos, as valvas e o miocárdio.



Fonte: Adaptado de Marieb et al. (2014, p. 592).

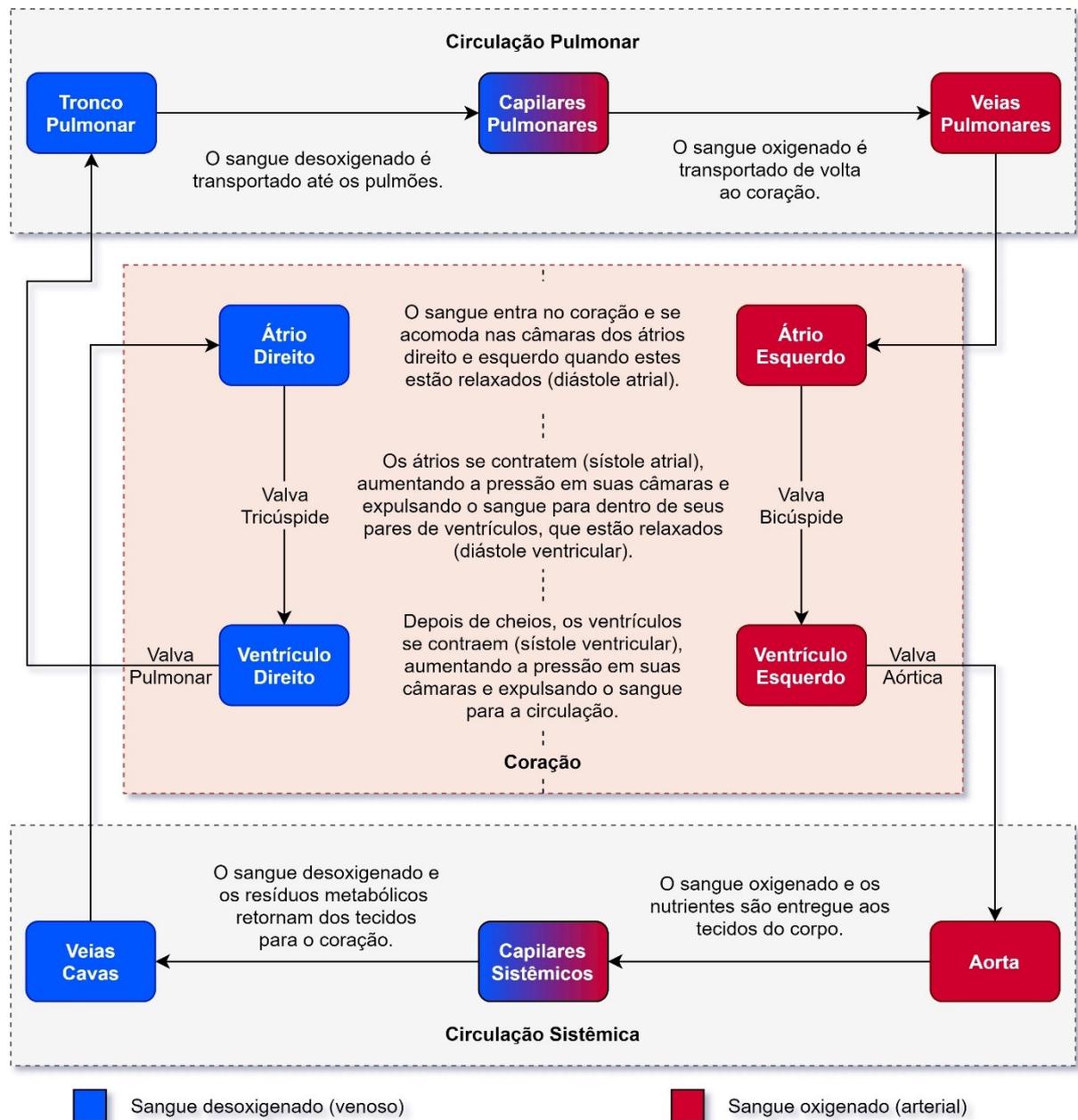
Figura 3 – Anatomia dos vasos sanguíneos: as artérias, as veias e os capilares sanguíneos. Os vasos arteriais possuem maior musculatura lisa e fibras elásticas e os vasos venosos possuem valvas para o retorno venoso.



Fonte: Adaptado de Marieb et al. (2014, p. 614).

O fluxograma da Figura 4 resume a dinâmica do SCV. Conforme ilustrado, o sangue flui continuamente e em sentido único dentro do sistema. Isto ocorre graças à presença de valvas entre cada par átrio-ventrículo (valvas tricúspide e bicúspide) e entre cada ventrículo e as saídas do coração (valvas pulmonar e aórtica) (ver Figura 2). Além delas, valvas presentes ao longo dos vasos venosos (ver Figura 3) limitam o retorno do sangue, auxiliando a condução de volta ao coração (GUYTON; HALL, 2011; MARIEB; WIHELM; MALLATT, 2014).

Figura 4 – Dinâmica cardiovascular: as fases do bombeamento cardíaco e o fluxo sanguíneo arterial (vermelho: oxigenado) e venoso (azul: desoxigenado) unidirecional pelo coração e pelas circulações pulmonar e sistêmica.

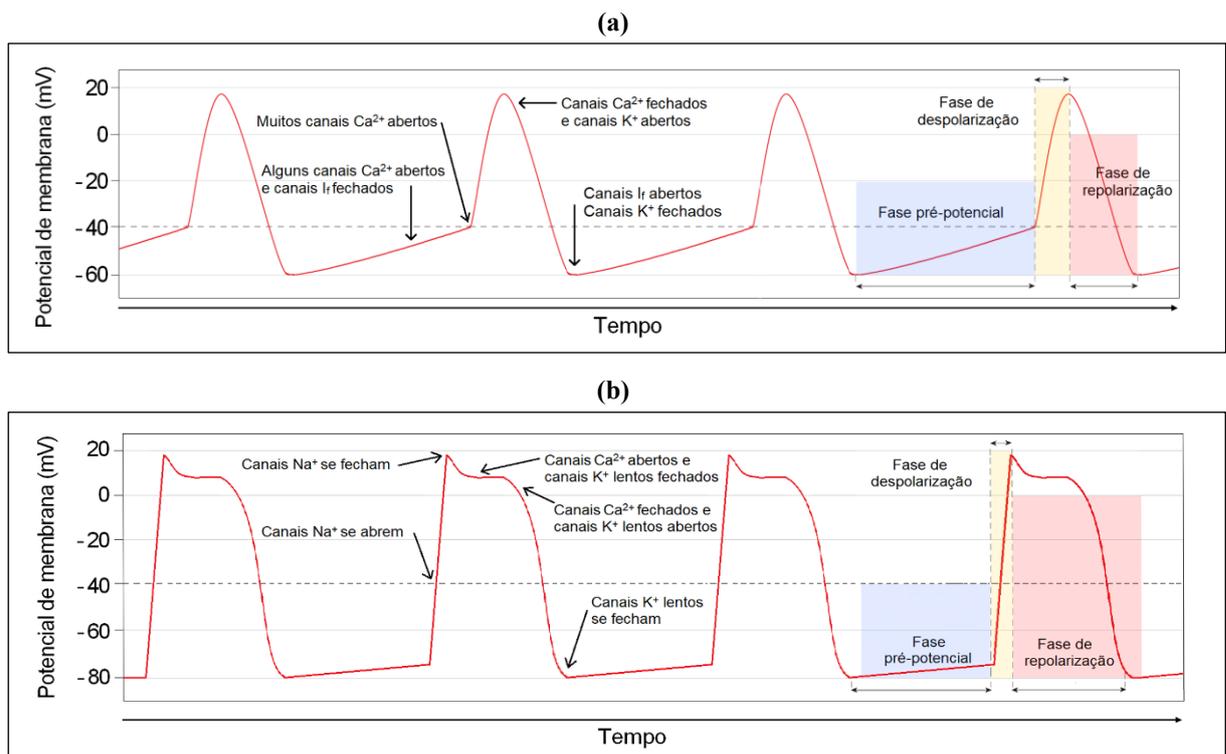


Fonte: Elaborado pelo Autor.

Diferente das células nervosas e musculares esqueléticas, as células miocárdicas não possuem potencial de repouso; elas ficam constantemente se despolarizando graças a presença de canais iônicos especiais que se abrem ao final de toda repolarização, chamados Canais de Corrente *Funny* (I_f) (CÉSAR, 2007). Dessa forma, a dinâmica cardiovascular se repete ciclicamente. Os ciclos são controlados pelo chamado complexo excito-condutor do coração, sistema composto por células miocárdicas especializadas em gerar impulsos elétricos de forma acelerada, conhecidas como células marcapasso (IAZZO; LASKE, 2010; SILVERTHORN, 2017).

As células marcapasso possuem maior quantidade de I_f em comparação às demais células marcapasso, por isso, ditam os ciclos cardíacos: na fase pré-potencial, o influxo de Na^+ pelos canais I_f eleva o potencial de membrana gradualmente até o limiar de excitabilidade; quando atingido, abrem-se os canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes resultando na despolarização da célula; seguido por repolarização devido a efluxo de K^+ . Dessa forma, um potencial de ação origina-se espontaneamente nessas células; ele é chamado potencial marcapasso (CÉSAR, 2007; IAZZO; LASKE, 2010; SILVERTHORN, 2017). A Figura 5 (a) ilustra o potencial de membrana das células marcapasso.

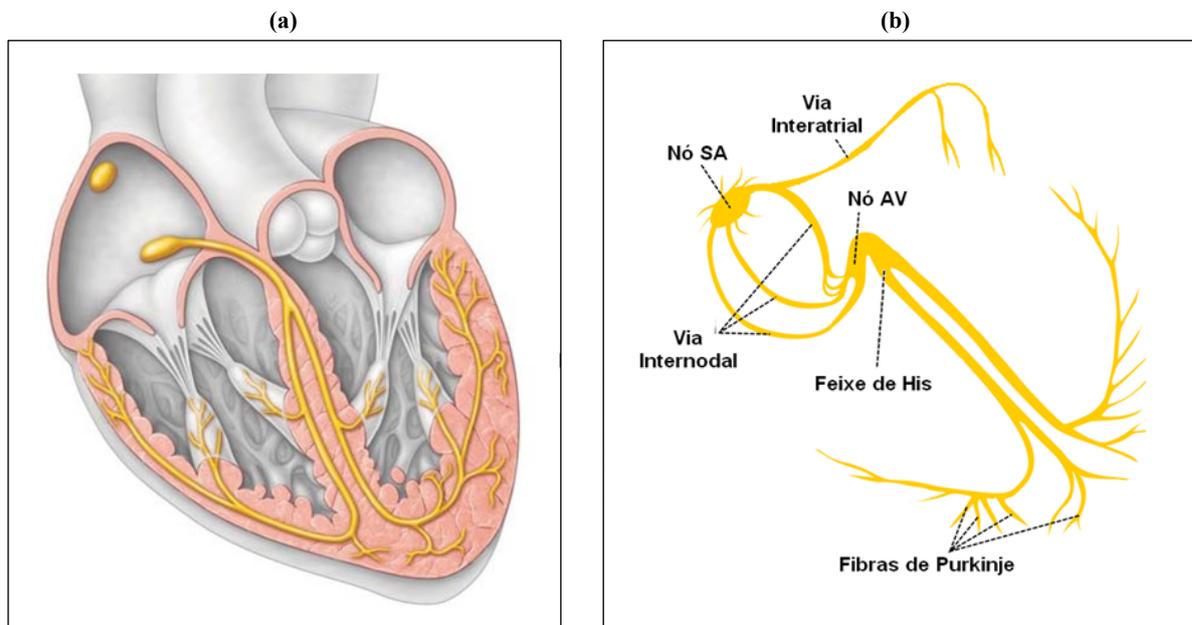
Figura 5 – Potencial de membrana das células miocárdicas: as fases do potencial e a mecânica dos canais iônicos nas (a) células marcapasso e nos (b) cardiomiócitos ventriculares.



Fonte: Adaptado de Silverthorn (2017, p. 451 e 453).

As estruturas que formam o complexo excito-condutor são: Nó Sinoatrial (SA), Nó Atrioventricular (AV), Feixe de His, Fibras de Purkinje e vias internodais e interatrial. A Figura 6 ilustra essas estruturas. O Nó SA é a unidade principal do sistema, estrutura que contém a maior concentração de células marcapasso e com maior quantidade de I_f ; por isto, em condições saudáveis, o potencial marcapasso origina-se primeiro em alguma das células do Nó SA, então estimula as células marcapasso vizinhas, dando início ao potencial de ação que percorre todo o complexo estimulando as células contráteis do miocárdio e conferindo ao coração a propriedade exclusiva de se auto contrair (IAIZZO; LASKE, 2010; MARIEB; WIHELM; MALLATT, 2014). O Quadro 1 apresenta a função de cada estrutura do complexo.

Figura 6 – O completo excito-condutor do coração: (a) o complexo no coração e (b) suas estruturas.



Fonte: Adaptado de Marieb et al. (2014, p. 601).

Quadro 1 - Estruturas que formam o complexo excito-condutor do coração e suas funções.

Estrutura	Função
Nó Sinoatrial (SA)	Fonte primária de geração de potencial marcapasso: gera em torno de 60-70 potenciais por minuto*.
Via interatrial	Permite rápida passagem do potencial para o átrio esquerdo.
Vias internodais	Permitem rápida passagem do potencial para o Nó AV.
Nó Atrioventricular (AV)	Retarda a condução do potencial antes de chegar ao feixe de His. É a fonte secundária de geração de potencial marcapasso, ativada na falha do Nó SA: gera em média 40 potenciais por minuto*.
Feixe de His	Acelera a condução do potencial até o ápice do coração.
Fibras de Purkinje	Distribui o potencial pelos ventrículos, de baixo para cima.

Fonte: Adaptado de Iaizzo et al. (2010) e Marieb et al. (2014).

* Valores nominais característicos de pessoas adultas saudáveis e em estado basal (repouso).

O processo de despolarização das células contráteis do miocárdio – chamados de cardiomiócitos – ocorre de forma mais acelerada que o processo de despolarização das células marcapasso (especialmente nos cardiomiócitos ventriculares). Junções comunicantes nas membranas de cardiomiócitos adjacentes permitem a passagem de íons diretamente do interior de uma célula para outra (*i.e.*, sinapse elétrica) difundindo a excitação contrátil originada por um potencial marcapasso ao longo de todo o miocárdio. Assim, o limiar de excitabilidade dos cardiomiócitos é atingido rapidamente, e canais iônicos voltagem-dependentes são abertos. A despolarização então acontece devido a influxo de Na^+ ; seguido por repolarização devido a efluxo de K^+ (GUYTON; HALL, 2011; SILVERTHORN, 2017). A Figura 5 (b) ilustra o potencial de membrana dos cardiomiócitos ventriculares.

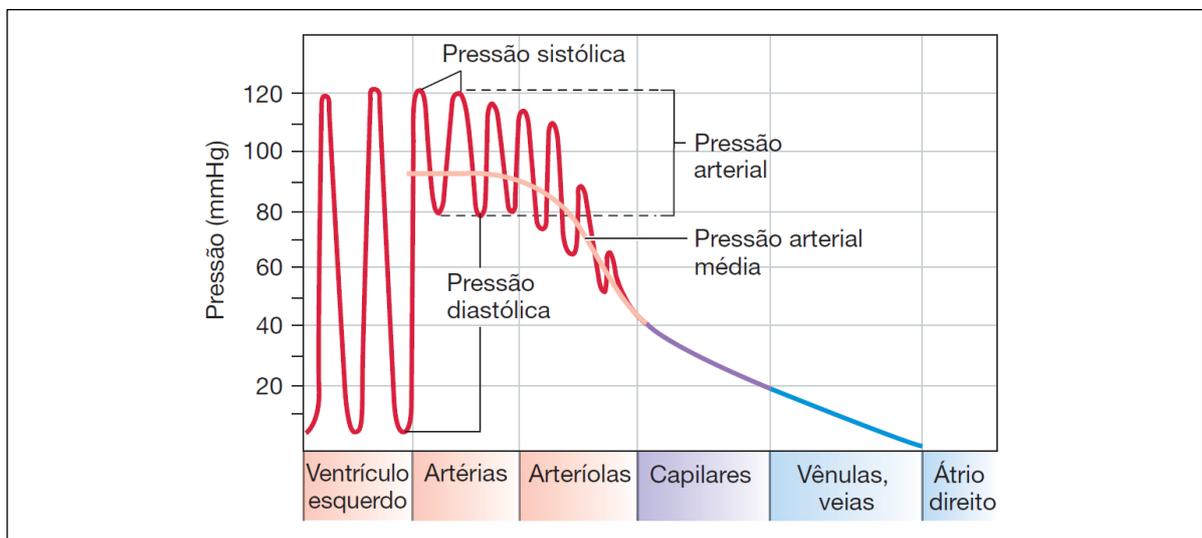
Uma característica peculiar observada nos cardiomiócitos ventriculares é o período despolarizado mais longo do potencial de membrana (ver Figura 5b). Este prolongamento acontece devido ao influxo lento de Ca^{2+} que se inicia e contrabalança o efluxo de K^+ no começo da fase de repolarização, criando um efeito de “platô” no potencial de membrana. O aumento no Ca^{2+} intracelular estimula o retículo sarcoplasmático a liberar seu estoque de Ca^{2+} , processo denominado “liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} ”. Os íons Ca^{2+} então difundem-se pelos sarcômeros (unidades contráteis) e promovem o deslizamento dos filamentos de actina sobre os filamentos de miosina, encurtando as miofibrilas (conjunto de sarcômeros sequenciais) e resultando na contração da fibra cardíaca. O atraso na fase de repolarização visto no potencial de membrana reflete a contração sustentada do miocárdio. A remoção do cálcio do citoplasma então encerra o processo de contração muscular (KOEPPEN; STANTON, 2009; SILVERTHORN, 2017).

2.1.2 Métricas da Fisiologia Cardiovascular

A força motriz para a circulação do sangue é a pressão arterial (PA). Ela é gerada na sístole ventricular com a injeção do sangue dentro do sistema circulatório e é condicionada pela propriedade elástica das paredes da artéria aorta e suas ramificações que se distendem na sístole ventricular acomodando o sangue sob alta pressão e, ao retornarem ao calibre original, na diástole ventricular, liberam a parte da energia sistólica que ficou acumulada nas paredes, auxiliando o fluxo e a distribuição do sangue (GUYTON; HALL, 2011; KOEPPEN; STANTON, 2009; MARIEB; WIHELM; MALLATT, 2014; SILVERTHORN, 2017).

A PA é então definida como a força do sangue exercida contra a superfície interna dos vasos sanguíneos decorrente do bombeamento cardíaco (SBC, 2016); ela é, portanto, uma variável física (força por unidade de área), geralmente medida em milímetros de mercúrio (mmHg). A Figura 7 ilustra a PA dentro da circulação sistêmica. Ela é maior nas artérias e diminui gradualmente à medida que o sangue escoar pelo sistema: a energia do fluxo diminui devido à resistência oferecida pelos vasos e ao próprio atrito entre as células sanguíneas e os vasos (KOEPPEN; STANTON, 2009; SILVERTHORN, 2017).

Figura 7 – Pressão sanguínea na circulação sistêmica: as ondas de pressão geradas pela contração ventricular percorrem os vasos sanguíneos e diminuem em amplitude com a distância, desaparecendo nos capilares.



Fonte: Adaptado de Silverthorn (2017, p. 483).

Em indivíduos adultos saudáveis, a PA alcança em média 120 mmHg durante a sístole ventricular (pressão arterial sistólica – PAS) e 80 mmHg na diástole ventricular (pressão arterial diastólica – PAD) (ver Figura 7). Como a PA tem característica pulsátil, costuma-se utilizar a pressão arterial média (PAM) para representar a força direcionadora do fluxo. A Equação 1 expressa o cálculo da PAM (KOEPPEN; STANTON, 2009; SILVERTHORN, 2017).

$$PAM = PAD + \frac{(PAS - PAD)}{3} \quad (1)$$

A PA – ou PAM – é a responsável direta pela manutenção da perfusão tecidual. Se a PAM cai muito (*i.e.*, hipotensão), a força direcionadora do fluxo sanguíneo é incapaz de superar a oposição da gravidade. Nesse caso, o fluxo de sangue e a oferta de oxigênio e nutrientes são

prejudicados. Por outro lado, se a PAM estiver cronicamente elevada (*i.e.*, hipertensão), a alta pressão sobre a parede interna dos vasos pode causar rupturas em áreas enfraquecidas e ocasionar sangramento nos tecidos (*i.e.*, hemorragia). Para garantir a homeostase do organismo, é necessário um balanceamento contínuo da PAM, trabalho esse exercido pelo coração e pelos vasos sanguíneos (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2005; SILVERTHORN, 2017).

De modo geral, o trabalho exercido pelo coração pode ser quantificado em duas principais variáveis físicas: a frequência cardíaca (FC) e o volume sistólico (VS). A FC – também chamada de ritmo cardíaco – corresponde à quantidade de batimentos que o coração executa em um determinado período, ou seja, a quantidade de vezes que o coração carrega e expulsa sangue para a circulação, geralmente mensurada em batimentos por minuto (bpm). Já o VS corresponde ao volume de sangue ejetado à cada batimento, volume resultante da combinação do enchimento ventricular (pré-carga), da contratilidade do miocárdio ventricular e da resistência oferecida à ejeção do sangue (pós-carga). Quando combinadas, a FC e o VS formam o chamado débito cardíaco (DC), variável que representa o volume de sangue ejetado na circulação em um determinado período de tempo, geralmente expresso em mililitros de sangue por minuto (ml/min). A Equação 2 expressa a relação da FC, VS e DC (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2005; KOEPPEN; STANTON, 2009; SILVERTHORN, 2017).

$$DC = FC \times VS \quad (2)$$

O aumento ou a diminuição do DC busca suprir as demandas metabólicas de acordo com cada atividade desempenhada pelo organismo. Em momentos de repouso, por exemplo, a FC característica de adultos saudáveis varia entre 60 e 70 bpm. Essa frequência é denominada como FC basal (FC_b), uma média da FC no repouso. Conseqüentemente, o DC é mais baixo na FC_b. Contudo, para suprir a carga energética exigida na realização de atividades mais intensas, a FC e o VS são elevadas (modulação apresentada no subtópico 2.2.2) resultando no aumento do DC. (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2005; KOEPPEN; STANTON, 2009; MALIK et al., 1996; SILVERTHORN, 2017)

Uma vez ejetado, o sangue escoar pelos vasos sanguíneos, e esse fluxo obedece às leis da mecânica dos fluidos: ele é diretamente proporcional ao gradiente de pressão e inversamente proporcional à resistência oferecida pelos vasos sanguíneos, chamada de resistência periférica total (RPT). Como o comprimento do sistema circulatório e a viscosidade do sangue são relativamente constantes, o diâmetro interno dos vasos sanguíneos é a variável que se opõe à

passagem do sangue. Dentre os três tipos de vasos, as arteríolas são os que possuem maior quantidade de musculatura lisa (ver Figura 3), o que lhes permite, por meio do ajuste da espessura da parede, variar seus volumes internos (*i.e.*, fazer vasodilatação ou vasoconstrição). Assim, as arteríolas são os principais vasos moduladores da RPT (KOEPPEN; STANTON, 2009; SILVERTHORN, 2017).

A Equação 3 descreve a forma direta de cálculo da PAM considerando a relação com as variáveis cardíacas e vascular apresentadas. Assim, por meio da modulação da FC, VS e RPT, é possível ajustar a PAM para garantia da homeostase do organismo em diferentes situações do dia (KOEPPEN; STANTON, 2009; SILVERTHORN, 2017).

$$PAM = DC \times RPT \quad (3)$$

$$PAM = (FC \times VS) \times RPT$$

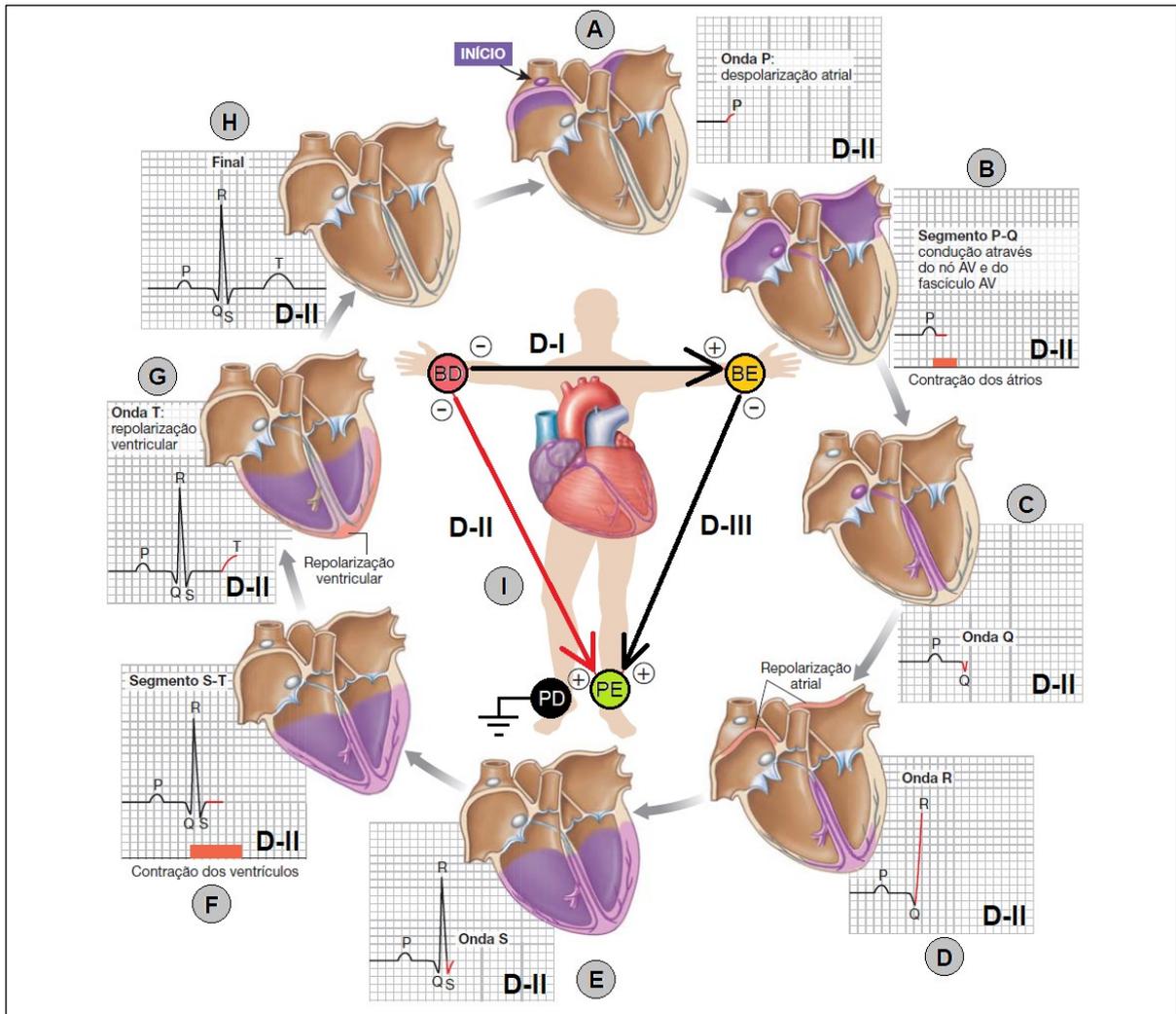
2.1.3 Eletrocardiograma (ECG)

O Eletrocardiograma (ECG) é o registro da atividade elétrica do coração. A passagem dos potenciais de ação pelo miocárdio gera uma corrente de fluxo iônico extracelular que se propaga por todos os tecidos e chega na periferia do corpo, refletindo o biopotencial cardíaco na superfície da pele. Ao posicionar eletrodos em pontos estratégicos sobre a pele é possível captar tal biopotencial e, após tratá-lo (*i.e.*, amplificar e filtrar), é possível visualizar o sinal como se os eletrodos estivessem posicionados próximos ao miocárdio. O ECG é, portanto, o sinal que representa a soma dos múltiplos potenciais de ação trafegando pela musculatura cardíaca, uma técnica segura e eficaz para avaliação das estruturas cardíacas (EINTHOVEN, 1957; KLIGFIELD et al., 2007; WEBSTER, 2009).

A Figura 8 ilustra o ciclo cardíaco e a formação do sinal de ECG. Cada evento (estágios de ‘A’ a ‘H’) é responsável pela formação de uma componente do sinal (ondas e segmentos). Tudo começa com o potencial marcapasso gerado nas células do Nó SA. Em milésimos de segundos, o potencial chega e se espalha pelas células contráteis dos átrios direito e esquerdo que então se contraem (sístole atrial) e expulsam o sangue para os ventrículos (que estão relaxados – diástole ventricular). A despolarização das células atriais é a principal contribuinte para a formação da Onda P (Figura 8 A). Antes mesmo de finalizar a sístole atrial, o potencial já chegou no Nó AV por meio das vias internodais. Contudo, a passagem do impulso elétrico através do Nó AV é lenta, permitindo tempo para contração muscular suficiente dos átrios

(essencial para maximizar o enchimento dos ventrículos). Este atraso na condução é responsável pela formação do Segmento P-Q (Figura 8 B) (DAVEY; SHARMAN, 2018; IAIZZO; LASKE, 2010; KLIGFIELD et al., 2007).

Figura 8 – O ciclo cardíaco e a formação das ondas, segmentos e intervalos do sinal de ECG. Registro feito pela derivação bipolar D-II. A seta vermelha ilustra o vetor formado pelos eletrodos BD e PE e o sentido da medição.



Fonte: Adaptado de Silverthorn (2017, p. 461).

A partir do Nó AV, o potencial de ação é acelerado. Ele percorre o septo interventricular, passando pelo fascículo do Feixe de His e seus ramos, até chegar no ápice do coração. Essa rápida aceleração forma a Onda Q (Figura 8 C) e a Onda R (Figura 8 D). No ápice, o impulso elétrico espalha-se pelas Fibras de Purkinje e estimula as paredes dos ventrículos direito e esquerdo que se contraem (sístole ventricular) expulsando o sangue para as circulações. A ascensão do impulso elétrico espalhando-se pelos ventrículos forma a Onda S (Figura 8 E). Em geral, o Complexo QRS representa a progressiva onda de despolarização

ventricular. Nele, também está incorporada à fase de repolarização e relaxamento dos átrios (diástole atrial). O Segmento S-T representa o intervalo entre a despolarização e a repolarização ventricular, momento de contração ventricular sustentada (Figura 8 F). Por fim, a Onda T representa a repolarização e relaxamento dos ventrículos (diástole ventricular) (Figura 8 G) (DAVEY; SHARMAN, 2018; IAIZZO; LASKE, 2010; KLIGFIELD et al., 2007).

Como a onda de despolarização cardíaca segue em direção e sentido bem definidos, os locais de posicionamento dos eletrodos impactam diretamente no formato do sinal de ECG (WEBSTER, 2009). O Triângulo de Einthoven é a configuração mais frequentemente utilizada (ilustrada ao centro – Figura 8 I). Ela consiste no posicionamento de três eletrodos de medição: (1) braço direito (BD) ou na parte superior direita do tórax; (2) braço esquerdo (BE) ou na parte superior esquerda do tórax; e (3) perna esquerda (PE) ou na parte inferior esquerda do tórax (KLIGFIELD et al., 2007). Um quarto eletrodo geralmente é colocado na perna direita (PD) ou na parte inferior direita do tórax para agir como referência eletrônica e reduzir ruídos captados na medição (BUTTERWORTH; THORPE, 1951; KAPLAN BERKAYA et al., 2018). Esta configuração permite observar o coração em plano frontal, como que encaixando o coração dentro de um triângulo (KLIGFIELD et al., 2007; WEBSTER, 2009).

A formação do sinal consiste no registro da diferença de potencial medido em dois locais diferentes, como que analisando o deslocamento do fluxo iônico com relação ao vetor formado por estes pontos (WEBSTER, 2009). Uma derivação bipolar é um registro da diferença de potencial elétrico entre um par de eletrodos. Na configuração Triângulo de Einthoven, a derivação I (D-I) mede a diferença de potencial de BD para BE, a derivação II (D-II) de BD para PE, e a derivação III (D-III) de BE para PE (BUTTERWORTH; THORPE, 1951). É possível também fazer a combinação de dois eletrodos e analisar a diferença de potencial entre o par formado e o eletrodo restante, formando as chamadas derivações unipolares aumentadas.

Vale destacar que cada derivação registra o sinal de ECG com formato e amplitude diferentes, pois resultam em vetores com direção e sentido diferentes. Cada forma do sinal permite inferir características cardíacas intrínsecas específicas; por isto, se o objetivo é avaliar a atividade elétrica cardíaca, é necessário analisar o ECG em todas as derivações (KLIGFIELD et al., 2007). Para análise clínica geral, a D-II é a derivação mais comumente usada, pois o seu posicionamento é o que mais vetorialmente se justapõe a direção e sentido de propagação da onda despolarizante, por isto, por meio dele, é possível avaliar a atividade elétrica cardíaca geral (DAVEY; SHARMAN, 2018; WEBSTER, 2009). O sinal de ECG ilustrado na Figura 8 representa um registro feito via D-II.

2.2 INTERAÇÃO NEURO-CARDIOGÊNICA E NEURO-VASCULAR

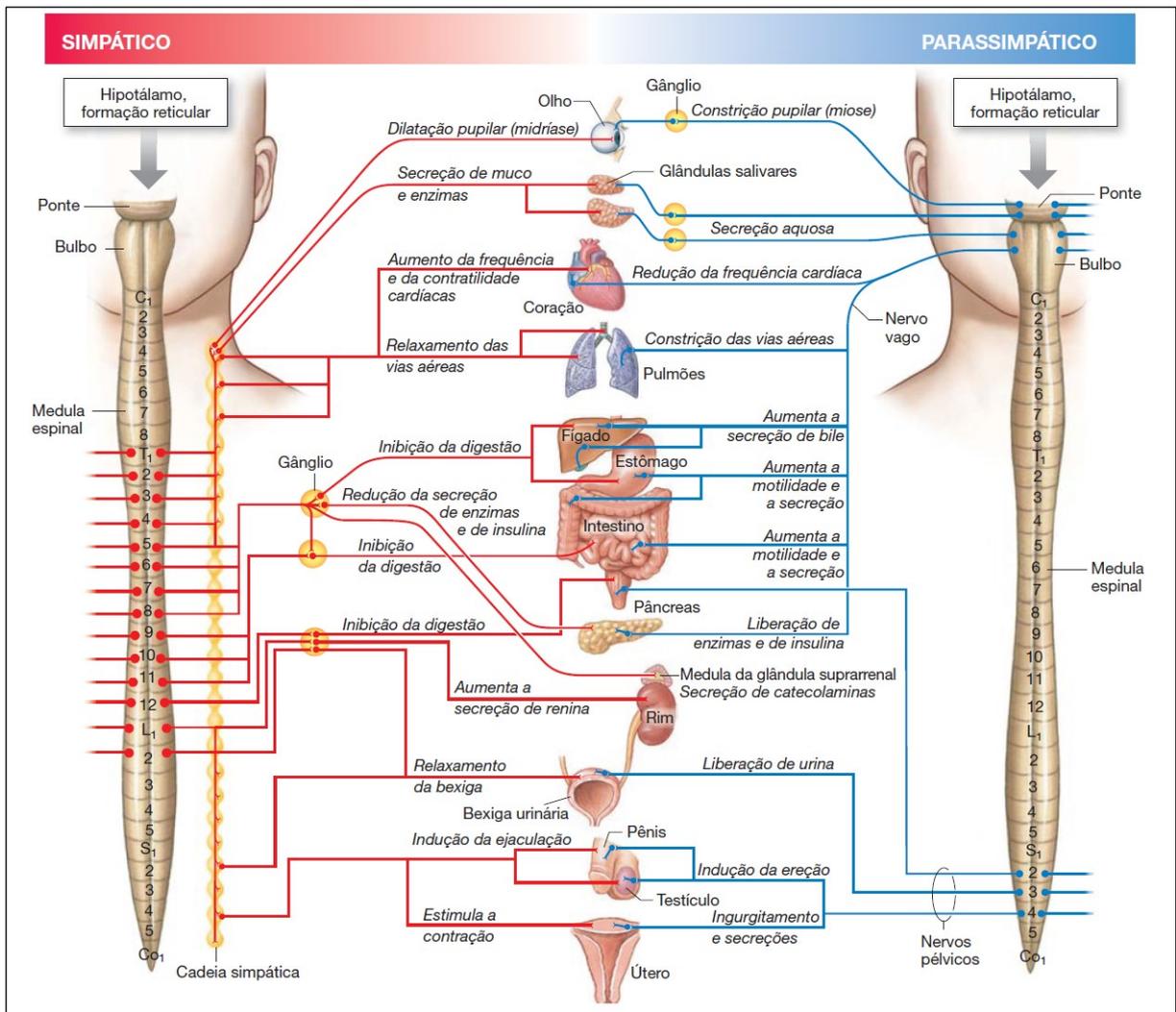
2.2.1 Sistema Nervoso Autônomo (SNA)

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) consiste em uma extensa rede de neurônios motores estruturada e bem distribuída que atua em resposta a estímulos aferidos no ambiente corporal interno e externo para controle de toda a fisiologia: funções cardiovasculares, respiratórias, gastrointestinal, térmicas, urinárias, excretórias, de reprodução e endócrinas; desempenhando papel fundamental na homeostase (ROBERTSON et al., 2012; SILVERTHORN, 2017; SQUIRE et al., 2008).

O SNA é organizado em dois segmentos distintos: o sistema nervoso simpático (SNS) e o sistema nervoso parassimpático (SNP). A Figura 9 ilustra essa divisão e a origem das diversas vias de cada segmento. Cada via é formada por um par de neurônios pré-ganglionar (mais central) e pós-ganglionar (mais periférico), por isso, são chamadas de vias di-sinápticas. Os neurônios pré-ganglionares de ambos os sistemas liberam acetilcolina (ACh) nas sinapses com seus respectivos pares pós-ganglionares. Enquanto os neurônios pós-ganglionares do SNP também liberam ACh nos órgãos-alvos, os neurônios pós-ganglionares do SNS secretam adrenalina e noradrenalina (NA). A NA interage com receptores α -adrenérgicos e β -adrenérgicos, enquanto a ACh interage com receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos e atua mais localmente (ROBERTSON et al., 2012; SILVERTHORN, 2017).

De modo geral, o SNS e o SNP resultam em efeitos fisiológicos opostos. Enquanto o SNS mobiliza estoques de energia e intensifica o catabolismo, o SNP preconiza reduzir o gasto de energia e formar estoques para manutenção do organismo (ROBERTSON et al., 2012; SILVERTHORN, 2017; SQUIRE et al., 2008). Embora produzam efeitos opostos, todavia, os dois sistemas operam em paralelo; o efeito final sobre o órgão-alvo, *i.e.*, elevação ou redução das funções efectoras do órgão, é resultado da soma antagonista dos contínuos disparos enviados por cada sistema. Por exemplo: em condições saudáveis, quando as funções autonômicas estão preservadas, a realização de atividades de maior intensidade promovem maior frequência de disparo de potenciais do SNS – tônus simpático (maior liberação de NA nos órgãos-alvo) –, enquanto que em casos de menor necessidade energética, como durante a digestão e no repouso, ocorre sobreposição de potenciais do SNP – tônus parassimpático (maior liberação de ACh nos órgãos-alvo) (ROBERTSON et al., 2012; SQUIRE et al., 2008).

Figura 9 – Sistema Nervoso Autônomo: divisões simpática e parassimpática.



Fonte: Adaptado de Silverthorn (2017, p. 362).

2.2.2 Funções Autonômicas Cardiovasculares

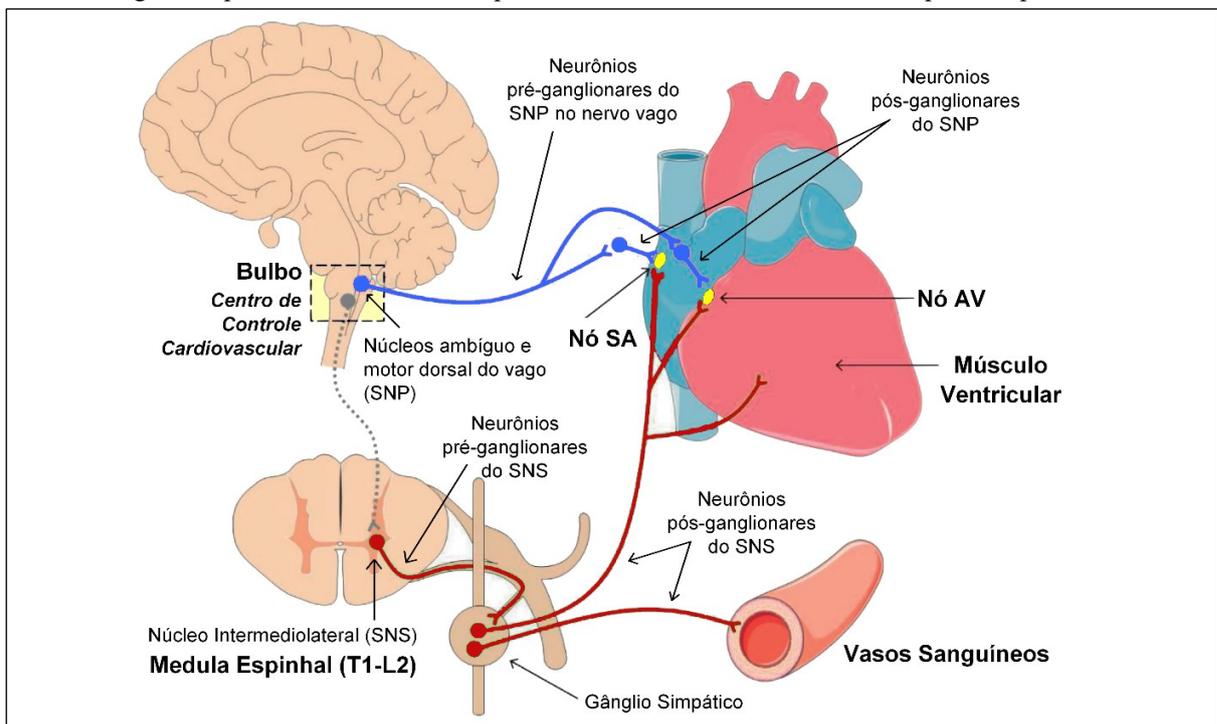
A regulação do SCV ocorre de forma contínua e inconsciente. Essa regulação é coordenada por um conjunto de neurônios especializados que compõem o chamado centro de controle cardiovascular localizado no bulbo (*i.e.*, medula oblongada) – parte inferior do tronco encefálico. Esse centro pode ser subdividido em três partes: (1) centro cardioinibidor (cardíaco parassimpático), (2) centro cardioacelerador (cardíaco simpático) e (3) centro vasomotor (ROBERTSON et al., 2012; SQUIRE et al., 2008).

Para promover a regulação do SCV, esses três centros recebem (1) informações centrais oriundas do hipotálamo, da substância cinzenta, do núcleo amigdalóide e do córtex da ínsula e (2) informações periféricas entregues no núcleo do trato solitário (NTS) oriundas de

aferentes viscerais presentes em vasos sanguíneos, coração, pulmões, músculos esqueléticos, pele e vísceras. Então, os três centros processam os sinais recebidos e acionam os neurônios pré-motores do SNS e do SNP (MARIEB; WIHELM; MALLATT, 2014; ROBERTSON et al., 2012; SQUIRE et al., 2008).

A Figura 10 ilustra as estruturas envolvidas na interação neuro-cardiogênica e neuro-vascular. O SNS cardíaco tem origem no núcleo intermediolateral localizado na região T1-T4 da medula espinhal, de onde partem os neurônios simpáticos pré-ganglionares. Após sinapse na cadeia simpática, os neurônios pós-ganglionares simpáticos cardíacos chegam ao coração no Nó SA, no Nó AV e nos cardiomiócitos dos átrios e dos ventrículos, onde liberam NA. O SNS vascular tem origem no núcleo intermediolateral de T1-L2 e, após sinapse na cadeia simpática, os neurônios pós-ganglionares simpáticos vasculares chegam à musculatura lisa dos vasos sanguíneos e liberam NA. Por sua vez, o SNP cardíaco tem origem no núcleo ambíguo e núcleo motor dorsal do vago – *i.e.*, a origem do SNP é no próprio centro cardioinibidor –, então os neurônios pré-ganglionares viajam pelo nervo vago e, após sinapse no gânglio já bem próximo ao coração, os neurônios pós-ganglionares parassimpáticos cardíacos chegam no Nó SA e no Nó AV (e nos cardiomiócitos ventriculares, porém com efeito menor), onde liberam ACh (GORDAN; GWATHMEY; XIE, 2015; ROBERTSON et al., 2012; SQUIRE et al., 2008).

Figura 10 – Interação neuro-cardiogênica e neuro-vascular: caminhos de atuação e inervação do coração e dos vasos sanguíneos pelo sistema nervoso simpático, em vermelho, e sistema nervoso parassimpático, em azul.



Fonte: Adaptado de Rocha et al. (2021, p. 816).

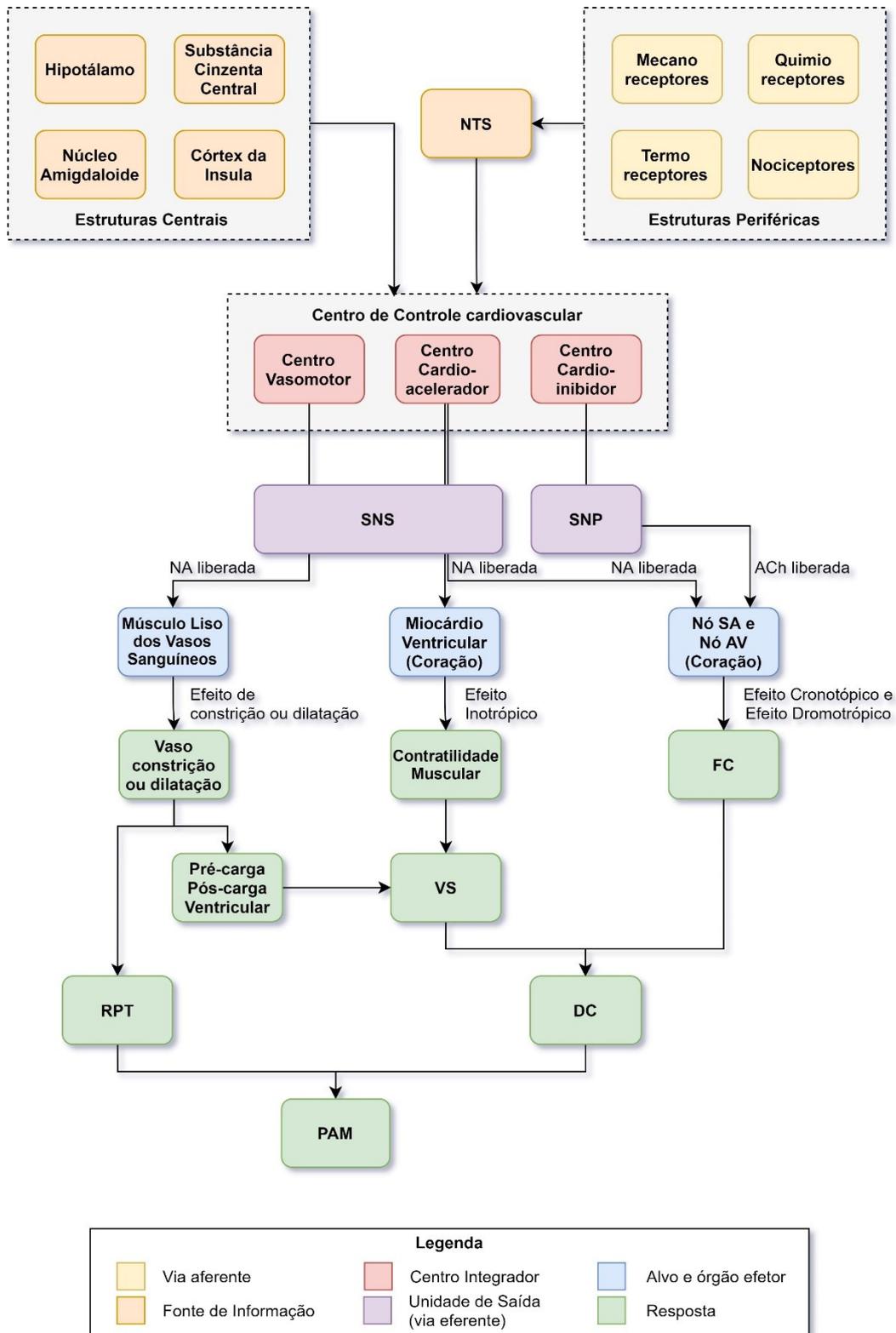
Basicamente, o controle autonômico regula quatro efeitos cardiovasculares: (1) efeito cronotrópico, referente à variação da frequência de disparo de potenciais marcapasso; (2) efeito dromotrópico, referente à variação da condutividade do sinal elétrico; (3) efeito inotrópico, referente à variação da contratilidade do músculo cardíaco; e (4) constrição-dilatação dos vasos sanguíneos. Ambos os sistemas SNS e SNP controlam proporcionalmente os efeitos cronotrópico e dromotrópico, contudo, os efeitos inotrópico e de vasoconstrição-dilatação mais significativos são regulados pela divisão simpática; por isso, o papel da atividade parassimpática sobre os vasos sanguíneos e sobre a musculatura cardíaca é muitas vezes desconsiderado na análise, conforme ilustração da Figura 10 (GORDAN; GWATHMEY; XIE, 2015; ROBERTSON et al., 2012; SILVERTHORN, 2017; SQUIRE et al., 2008).

A Figura 11 apresenta o fluxograma do controle autonômico sobre o SCV, incluindo as estruturas e as vias envolvidas e as respostas fisiológicas dos órgãos efetores. Nos itens 1 a 3, a seguir, é fornecida uma descrição da regulação cardiovascular (GORDAN; GWATHMEY; XIE, 2015; ROBERTSON et al., 2012; SILVERTHORN, 2017; SQUIRE et al., 2008):

1 – A ativação de receptores adrenérgicos no Nó SA e AV – tônus simpático – aumenta o influxo de íons pelos canais I_f e Ca^{2+} , o que acelera a taxa de disparo de potenciais marcapasso (efeito cronotrópico positivo) e aumenta a condutividade do potencial (efeito dromotrópico positivo); como consequência, ocorre elevação da FC (*i.e.*, taquicardia) (ver Figura 11). Com relação aos cardiomiócitos, quando há elevada ativação de receptores adrenérgicos, aumenta-se a permeabilidade da membrana e o consequente influxo de Ca^{2+} nessas células, o que gera maior liberação de Ca^{2+} pelos retículos sarcoplasmáticos e maior contratilidade (força) do músculo cardíaco (efeito inotrópico positivo); como consequência, ocorre elevação do VS (ver Figura 11). Por outro lado, menor ativação de receptores adrenérgicos nos cardiomiócitos resulta em menor concentração de Ca^{2+} intracelular, o que diminui a contratilidade do miocárdio (efeito inotrópico negativo) e reduz o VS.

2 – A maior ativação de receptores adrenérgicos na musculatura lisa dos vasos sanguíneos – tônus simpático – resulta em engrossamento das paredes e redução dos volumes internos (efeito de vasoconstrição), elevando a resistência à passagem do sangue (*i.e.*, aumento da RPT) (ver Figura 11). Além disso, o engrossamento das paredes reduz o efeito de armazenamento/acomodação do sangue nos vasos, aumentando a pré-carga e pós-carga ventriculares e, conseqüentemente, o VS. Por outro lado, a menor ativação de receptores adrenérgicos causa estreitamento das paredes e expansão dos volumes internos (efeito de vasodilatação), resultando em menores RPT e VS.

Figura 11 – Controle neuro-cardiogênico e neuro-vascular: estruturas, vias, atuações e respostas fisiológicas.



Fonte: Adaptado de Silverthorn (2017, p. 494).

NTS: núcleo do trato solitário; SNS: sistema nervoso simpático; SNP: sistema nervoso parassimpático; SA: sinoatrial; AV: atrioventricular; FC: frequência cardíaca; VS: volume sistólico; RPT: resistência periférica total; DC: débito cardíaco; PAM: pressão arterial média.

3 – A ativação de receptores muscarínicos no Nó SA e AV – tônus parassimpático – aumenta a permeabilidade da membrana a K^+ (hiperpolarização das células) e diminui a permeabilidade a Ca^{2+} . A combinação desses dois efeitos retarda a taxa de despolarização da membrana, atrasando o início do potencial marcapasso (efeito cronotrópico negativo) e reduzindo a condutividade do sinal elétrico (efeito dromotrópico negativo), o que diminui a FC (*i.e.*, bradicardia) (ver Figura 11).

O Quadro 2 apresenta um resumo da descrição exposta nos itens acima.

Quadro 2 – Funções autonômicas cardiovasculares.

Órgão-alvo	Estrutura-alvo	Controle autonômico e efeito fisiológico sobre o órgão-alvo		
		Tônus Simpático	Tônus Parassimpático	
Coração	Nó SA e Nó AV	<u>Efeitos cronotrópico + e dromotrópico +</u> ↑ FC (taquicardia)	<u>Efeitos cronotrópico – e dromotrópico –</u> ↓ FC (bradicardia)	
	Miocárdio Ventricular	<u>Efeito inotrópico + *</u> ↑ Contratilidade e ↑ VS <u>Efeito inotrópico – †</u> ↓ Contratilidade e ↓ VS	<u>Efeito inotrópico –</u> ↓ Contratilidade	
	Miocárdio Atrial	<u>Efeito inotrópico + *</u> ↑ Contratilidade <u>Efeito inotrópico – †</u> ↓ Contratilidade	<u>Efeito inotrópico –</u> ↓ Contratilidade	
	Vasos Sanguíneos	Coronárias	<u>Efeito constrição *</u> Vasoconstrição <u>Efeito dilatação †</u> Vasodilatação	<u>Efeito dilatação</u> Vasodilatação
		Vasos Arteriais e Venosos	<u>Efeito constrição *</u> ↑ RPT (vasoconstrição) <u>Efeito dilatação †</u> ↓ RPT (vasodilatação)	-

Fonte: Adaptado de Robertson et al. (2012), Gordan et al. (2015) e Silverthorn (2017).

Nó SA: nó sinoatrial; Nó AV: nó atrioventricular; FC: frequência cardíaca; VS: volume sistólico; RPT: resistência periférica total; PAM: pressão arterial média; + positivo; – negativo; ↑ aumento; ↓ diminuição; * tônus simpático elevado; † tônus simpático reduzido.

Vale ressaltar que o controle tônico da FC é dominado pelo SNP. Quando todos os sinais do SNA para o coração são bloqueados experimentalmente, a frequência de disparo de potencial marcapasso do Nó SA é de 90-100 vezes por minuto. Assim, a FCb de 60-70 bpm característica de adultos saudáveis é resultante de tônus parassimpático (SILVERTHORN, 2017).

2.2.3 Manutenção da Pressão Arterial

Em termos de PA, o aumento da FC, do VS e da RPT – tônus simpático – resulta em elevação da PAM (ver Equação 3 e Figura 11). Por outro lado, a diminuição da FC e do VS – tônus parassimpático –, somados a diminuição da RPT – tônus simpático reduzido –, culminam na redução da PAM (SILVERTHORN, 2017).

Diversos mecanismos exercem papel importante para regulação precisa e contínua da PA. Alguns atuam de forma imediata (segundos) envolvendo mecanismos neurais, de ação local (fatores metabólicos e endoteliais) ou por ação de hormônios (sistema renina-angiotensina-aldosterona); outros englobam mecanismos de ação mais prolongada e duradoura, como acontece no feedback rins-fluidos corporais para rebalanceamento de líquido após ingestão/excreção (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2005; SILVERTHORN, 2017). Como o foco deste trabalho está nas funções autonômicas, serão descritos apenas mecanismos sob ação do SNA, resumidos no Quadro 3.

Quadro 3 – Efeitos fisiológicos dos reflexos barorreceptor, paralelo de baixa pressão e quimiorreceptor.

Órgão-alvo	Reflexo Barorreceptor		Reflexo Paralelo de Baixa Pressão		Reflexo Quimiorreceptor	
	PA reduzida	PA elevada	PA reduzida	PA elevada	PA reduzida	PA elevada
Coração	↑ FC e VS	↓ FC e VS	-	↑ FC	↓ FC	-
Vasos Sanguíneos	↑ RPT	↓ RPT	constrição	dilatação	↑ RPT	-
	constrição generalizada	dilatação generalizada	apenas dos vasos renais	apenas dos vasos renais	constrição generalizada	
Hipotálamo	-	-	↑ ADH	↓ ADH	-	-
Músculos respiratórios	-	-	-	-	↑ FR	-

Fonte: Elaborado pelo Autor.

PA: pressão arterial; FC: frequência cardíaca; VS: volume sistólico; RPT: resistência periférica total; ADH: hormônio antidiurético; FR: frequência respiratória; ↑ aumento; ↓ diminuição.

2.2.3.1 Reflexo Barorreceptor

Dentre as principais formas de monitoramento e regulação homeostática da PA, o mecanismo primário e mais importante é o chamado reflexo barorreceptor – ou simplesmente barorreflexo. Ele é um sistema de feedback negativo que ajusta a dinâmica simpática-parassimpática para balancear flutuações de PA (ROBERTSON et al., 2012).

A mecânica do barorreflexo é constituída de três componentes: (1) as vias aferentes, compostas por barorreceptores (*i.e.*, mecanorreceptores de pressão) que medem a força do

sangue contra a parede interna do arco da aorta e do seio carotídeo e deflagram potenciais de ação para o NTS; (2) o centro de controle cardiovascular que recebe os sinais dos barorreceptores processados no NTS; e (3) as vias eferentes (SNA) que regulam a atividade do coração e dos vasos sanguíneos de acordo com os comandos do centro de controle cardiovascular (ver Figura 11) (ROBERTSON et al., 2012; SILVERTHORN, 2017).

Quando da súbita diminuição da PA, como na hipotensão ortostática (mudança brusca de postura), os barorreceptores ficam menos pressionados pelo fluxo sanguíneo, sofrem menor estiramento e então deflagram potenciais de ação em menor frequência. O centro de controle cardiovascular então eleva o tônus simpático e reduz o tônus parassimpático, o que aumenta a FC, o VS e a RPT, resultando em elevação da PAM. Por outro lado, quando no aumento da PA, os barorreceptores sofrem maior estiramento e passam a disparar potenciais de ação em maior frequência, o que causa redução do tônus simpático e elevação do tônus parassimpático, resultando na diminuição da FC, do VS, da RPT e, conseqüentemente, da PAM (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2005; SILVERTHORN, 2017). O Quadro 3 apresenta um resumo dos efeitos fisiológicos mediados pelo reflexo barorreceptor.

2.2.3.2 Reflexo Paralelo de Baixa Pressão

Um grupo secundário de barorreceptores ficam localizados estrategicamente em locais de menor pressão: nos átrios e nas junções dos átrios com as correspondentes veias; por isso, são chamados de receptores de baixa pressão (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2005; KOEPPEN; STANTON, 2009; SILVERTHORN, 2017).

Tanto os barorreceptores de baixa pressão quanto os barorreceptores de alta pressão do reflexo barorreceptor são projetados para o NTS e seus respectivos reflexos buscam regular a PAM. Contudo, os mecanismos de regulação são diferentes. Enquanto o aumento do estiramento dos receptores de alta pressão reduz a FC (feedback negativo), o aumento do estiramento dos receptores de baixa pressão eleva a FC (feedback positivo). Além disso, enquanto o aumento do estiramento dos receptores de alta pressão causa vasodilatação generalizada (diminuição da RPT), o aumento do estiramento dos receptores de baixa pressão causa vasodilatação apenas nas artérias e arteríolas renais. Assim, o efeito líquido (taquicardia + vasodilatação renal) é o aumento do fluxo sanguíneo renal, conseqüentemente, maior produção de urina (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2005; KOEPPEN; STANTON, 2009; SILVERTHORN, 2017).

Além de se projetarem para o NTS, as fibras aferentes dos receptores de baixa pressão também fazem sinapses com neurônios que se projetam para a área do hipotálamo responsável por sintetizar o hormônio antidiurético (ADH). Enquanto o aumento do estiramento dos receptores de baixa pressão reduz a secreção de ADH, a diminuição do estiramento aumenta a secreção (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2005). Dessa forma, os receptores de baixa pressão são responsáveis por um reflexo paralelo: a taquicardia + vasodilatação renal aumenta o fluxo de sangue nos rins e a diminuição da secreção do ADH reduz a reabsorção de água; efeitos combinados que elevam a produção de urina e reduzem o volume de sangue na circulação, diminuindo a PAM. Por outro lado, a vasoconstrição dos rins e o aumento da secreção do ADH resultam em aumento do volume sanguíneo na circulação e elevam a PAM (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2005; KOEPPEN; STANTON, 2009; SILVERTHORN, 2017). O Quadro 3 apresenta um resumo dos efeitos fisiológicos mediados pelo reflexo paralelo de baixa pressão.

2.2.3.3 Reflexo Quimiorreceptor

A terceira forma de regulação da PAM é por meio do reflexo quimiorreceptor – ou simplesmente quimiorreflexo –, responsável pelo ajuste fino da PAM. Os quimiorreceptores desse reflexo são divididos em dois grupos: um localizado no bulbo e o outro, mais periférico, localizado próximo ao arco da aorta e no seio carotídeo, onde monitoram os níveis metabólitos locais (fluxo de perfusão tecidual) (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2005; SILVERTHORN, 2017).

Assim como as vias aferentes dos barorreceptores, as vias dos quimiorreceptores periféricos também viajam ao longo do nervo vago e se projetam para o NTS. Esses receptores começam a ser estimulados mais significativamente quando os níveis de P_{O_2} arteriais caem < 60 mmHg ou quando os níveis de P_{CO_2} ou H^+ aumentam ($P_{CO_2} > 40$ mmHg ou $pH < 7,4$), enquanto os quimiorreceptores bulbares são sensíveis ao pH do líquido intersticial encefálico, o qual é dependente da P_{CO_2} arterial (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2005; SILVERTHORN, 2017). Dessa forma, quando a PA está baixa, a redução do fluxo sanguíneo provoca escassez de O_2 e acúmulo de CO_2 e de H^+ locais, o que estimula os quimiorreceptores; eles então deflagram potenciais de ação para o NTS que, por sua vez, estimula o centro vasomotor, promovendo vasoconstrição (aumento da RPT) em ordem de elevar a PAM.

Contudo, diferente dos outros dois reflexos de pressão, o reflexo quimiorreceptor eleva não só o tônus simpático vascular geral como também parte do tônus parassimpático cardíaco. Isto ocorre porque, ao mesmo tempo que busca elevar a PAM, o reflexo busca reduzir o consumo de O₂, já que foi detectado baixo nível de Po₂ na circulação (e/ou alto nível de Pco₂) – interpretado como escassez no suprimento de O₂. Visando reestabelecer os níveis saudáveis de Po₂ e Pco₂, o reflexo quimiorreceptor estimula ainda o centro respiratório, este então eleva a frequência respiratória (FR) (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2005; ROBERTSON et al., 2012; SILVERTHORN, 2017). O Quadro 3 apresenta um resumo dos efeitos fisiológicos mediados pelo reflexo.

2.3 AVALIAÇÃO DE FUNÇÕES AUTONÔMICAS CARDIOVASCULARES E CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DA CAN

Conforme apresentado no subtópico 1.1.3 (Neuropatia Autonômica Cardiovascular (CAN)), a CAN se caracteriza pela disfunção de fibras autonômicas que inervam o coração e os vasos sanguíneos, resultando em anormalidades no controle cardíaco e na dinâmica vascular. Assim, a avaliação da CAN consiste em investigar a integridade funcional das vias autonômicas que regulam o SCV. Contudo, devido à complexidade em examinar o sistema nervoso de forma direta (*i.e.*, invasiva), a avaliação das funções autonômicas cardiovasculares baseia-se no monitoramento do comportamento do SCV por meio da mensuração das variáveis fisiológicas intrínsecas ao sistema (como FC e PA – subtópico 2.1.2), de modo a correlacionar as respostas cardiovasculares à interação neuro-cardiogênica e neuro-vascular (ver Quadro 2), *i.e.*, uma avaliação indireta da CAN (SPALLONE et al., 2011a).

Conforme apresentado no subtópico 1.1.4 (Desafios na Avaliação e Limitações no Diagnóstico da CAN), os métodos mais recomendados para avaliação das funções autonômicas cardiovasculares e diagnóstico da CAN, de acordo com a *American Diabetes Association* (POP-BUSUI et al., 2017a), o *Toronto Consensus Panel* (BERNARDI et al., 2011; SPALLONE et al., 2011b), a *Italian Society of Diabetology* (SPALLONE et al., 2011a) e a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2020), são: (1) os testes de reflexo autonômico cardiovasculares, (2) a análise dos índices de variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e no domínio da frequência; (3) análise do índice de sensibilidade barorreflexa e monitoramento contínuo da pressão arterial; e (4) análise do intervalo QT do sinal de eletrocardiografia.

De acordo com os objetivos do presente estudo, serão abordados apenas os métodos 1 e 2.

2.3.1 Testes de Reflexo Autonômico Cardiovasculares (CARTs)

Os testes de reflexo autonômico cardiovasculares (CARTs – *Cardiovascular Autonomic Reflex Test*) consistem em submeter os pacientes a manobras experimentais que induzem mudança no ambiente corporal interno e externo de modo a provocar adaptações reflexas à atividade cardíaca e à dinâmica vascular. São testes não-invasivos, sensíveis, específicos e clinicamente reproduzíveis, que permitem avaliar as funções autonômicas cardiovasculares por meio da análise da variação da FC e da PA (EWING et al., 1985; EWING; CAMPBELL; CLARKE, 1980; O'BRIEN; O'HARE; CORRALL, 1986).

Os CARTs para avaliação da CAN foram propostos inicialmente por David J. Ewing e colegas por volta dos anos 70 (EWING; CAMPBELL; CLARKE, 1980); por isso, são muitas vezes referidos como “Bateria de Ewing”. A bateria é composta pelas manobras: respiração profunda, manobra de Valsalva, mudança ortostática e preensão manual (aperto de mão sustentado) (EWING et al., 1985). Em diversos estudos, entretanto, a manobra de preensão manual mostrou-se ineficaz em avaliar o controle autonômico cardiovascular, passando a ser inutilizada por diversos autores. Um estudo ainda recente reavaliou a manobra e comprovou baixa acurácia diagnóstica para a CAN (KÖREI et al., 2017).

Além de lesões e doenças (como o DM), a variabilidade da FC e da PA são impactadas também pela idade do paciente, pois, no organismo como um todo, o envelhecimento compromete a funcionalidade do SNA e SCV (O'BRIEN; CORRALL, 1985). Por conta disso, Iain A. D. O'Brien e colegas realizaram um estudo no qual coletaram dados de 310 voluntários saudáveis entre 18 a 85 anos de idade e, a partir deles, construíram curvas de normalidade de FC para cada manobra dos CARTs, com faixas de idade de 5 em 5 anos (dos 20 aos 75 anos de idade) (O'BRIEN; O'HARE; CORRALL, 1986). O'Brien analisou também o comportamento da FCb dos participantes (*i.e.*, coleta feita da FC com o paciente deitado e em repouso) e definiu os intervalos saudáveis de FCb para complementar os CARTs.

As curvas de normalidade desenvolvidas por O'Brien relacionam as razões das FC mensuradas em cada manobra à idade do paciente, permitindo identificar a probabilidade de o paciente apresentar CAN (de acordo com a sua idade). Assim, se a razão obtida for superior ao índice de normalidade com intervalo de confiança de 90%, conclui-se que não há disfunção autonômica para aquela manobra executada (resposta normal). Já se a razão for inferior ao índice de normalidade com intervalo de confiança de 90%, porém superior ao índice de normalidade com intervalo de confiança de 95%, entende-se que há parcial disautonomia para

a manobra executada (resposta limítrofe). Contudo, por fim, se a razão for inferior ao índice de normalidade com intervalo de confiança de 95%, aceita-se que há considerável comprometimento do SNA em regular o SCV mediante àquela manobra executada (resposta anormal) (O'BRIEN; O'HARE; CORRALL, 1986).

Devido à grande contribuição de O'Brien para a investigação da CAN, a execução dos CARTs na prática clínica é comumente referida como “Protocolo O'Brien”. Após algumas adaptações, os testes propostos por Ewing e os critérios estabelecidos por O'Brien resultaram em CARTs compostos pelas seguintes manobras: (1) repouso, (2) respiração profunda, (3) manobra de Valsalva e (4) mudança ortostática. A função parassimpática é avaliada observando a variação da FC batimento a batimento (intervalos RR do sinal de ECG) que ocorre durante a realização de cada uma das quatro manobras, enquanto a função simpática é avaliada verificando-se a variação da PA (diferença) após a alteração de postura realizada na última manobra, totalizando, assim, 5 testes reflexos – 4 de FC e 1 de PA. Os detalhes para execução de cada manobra e os critérios de análise e interpretação de acordo com o Protocolo O'Brien são apresentados no Quadro 4 (BERNARDI et al., 2011; SPALLONE et al., 2011a; VINIK et al., 2018).

Após execução das manobras, a avaliação da CAN consiste em analisar as respostas normais, limítrofes e anormais resultantes de cada um dos 5 testes. Para facilitar a avaliação, costuma-se utilizar o método de pontuação composta (PC), *i.e.*, a soma dos pontos atribuídos às respostas obtidas: respostas normais têm peso 0, respostas limítrofes têm peso 1 e respostas anormais têm peso 2. Assim, o PC permite representar a severidade da CAN de 0 (quando todos os 5 testes resultam em respostas normais) a 10 (quando todos os 5 testes resultam em respostas anormais).

Em termos de diagnóstico, há grande disparidade na literatura. Um dos métodos mais utilizados classifica os pacientes em “sem CAN” para $PC < 2$, “CAN precoce” ou “CAN subclínica” para $2 \leq PC < 4$ e “CAN estabelecida” para $PC \geq 4$. Alguns incluem ainda a classificação “CAN avançada” ou “CAN grave” para $PC \geq 4$ com $\Delta PAS \leq -30$ mmHg (ver Quadro 4) considerando a disfunção simpática como indicativo do avançado da CAN. Esse critério é similar à classificação proposta por Ewing (apresentada na Figura 1). Alguns autores, entretanto, são mais conservadores e só consideram a CAN a partir do nível estabelecido ($PC \geq 4$); outros são mais cautelosos e consideram a CAN já a partir do nível subclínico ($PC \geq 2$). O Quadro 5 resume essas três formas de classificação.

Quadro 4 – Testes de Reflexo Autonômico Cardiovasculares (CARTs) de acordo com Protocolo O'Brien.

Manobra	Protocolo	Métrica	Interpretação	Respostas Normal, Limítrofe e Anormal
Etapa de Repouso (basal)	Permanecer em repouso, respirando calmamente por 5 min	$\frac{RR_M}{RR_m}$ FCb	Razão Max:Min (RR maior dividido pelo RR menor) Valor médio de FC basal	> 1,09* é normal = 1,08-1,09* é limítrofe < 1,08* é anormal ≥ 100 bpm é anormal
Respiração Profunda	Respirar a uma taxa média de 6 ciclos/min, <i>i.e.</i> , 5 s inspirando e 5 s expirando por 1 min	$\frac{RR_{M,E}}{RR_{m,I}}$	Razão E:I (RR maior durante a expiração dividido pelo RR menor durante a inspiração)	> 1,13* é normal = 1,10-1,13* é limítrofe < 1,10* é anormal
Manobra de Valsalva	Forçar expiração no bocal de um manômetro mantendo a pressão em 40 mmHg por 15 s (aumento da pressão intratorácica), seguido por 45 s de respiração normal para recuperação	$\frac{RR_{M,R}}{RR_{m,V}}$	Razão R:V (RR maior durante a recuperação dividido pelo RR menor durante a Valsalva)	> 1,29* é normal = 1,24-1,29* é limítrofe < 1,24* é anormal Normalmente, o RR mais curto ocorre no final da Valsalva, e o RR mais longo ocorre logo após a Valsalva
Mudança Ortostática	A partir da posição de decúbito dorsal, levantar-se em movimento contínuo e permanecer em pé por 2 min	$\frac{RR_{30^\circ}}{RR_{15^\circ}}$ ΔPAS	Razão 30:15 (RR do 30º batimento dividido pelo RR do 15º batimento – após se levantar) ΔPAS PAS 1 min após se levantar menos PAS basal	> 1,14* é normal = 1,12-1,14* é limítrofe < 1,12* é anormal Taquicardia seguida por bradicardia reflexa. > -10 mmHg é normal = -(10-29) é limítrofe ≤ -30 mmHg é anormal (avançada)

Fonte: Adaptado de O'Brien et. al (1986) e Vinik et al. (2018).

Todas as manobras são executadas com o paciente deitado em decúbito dorsal. * os valores de normalidade são ajustados para cada curva de idade (os valores informados referem-se ao grupo de 40-45 anos). FC: frequência cardíaca; FCb: frequência cardíaca basal (= FC média no repouso); PA: pressão arterial; PAS: pressão arterial sistólica; RR: intervalo RR; Max: máximo; Min: mínimo; E: expiração; I: inspiração; R: recuperação; V: Valsalva; min: minuto; s: segundos.

Quadro 5 – Principais critérios diagnósticos de CAN com base no método de PC da bateria de CARTs.

Resultado dos CARTs	Critério de Ewing-O'Brien	Critério Conservador	Critério Cauteloso
PC < 2	sem CAN	CAN-	CAN-
2 ≤ PC < 4	CAN subclínica		CAN+
PC ≥ 4	CAN estabelecida	CAN+	
PC ≥ 4 e ΔPAS ≤ -30 mmHg	CAN avançada		

Fonte: Elaborado pelo Autor.

CARTs: testes de reflexo autonômico cardiovasculares; PC: pontuação composta; CAN: neuropatia autonômica cardiovascular; -: negativo; +: positivo.

2.3.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca (HRV)

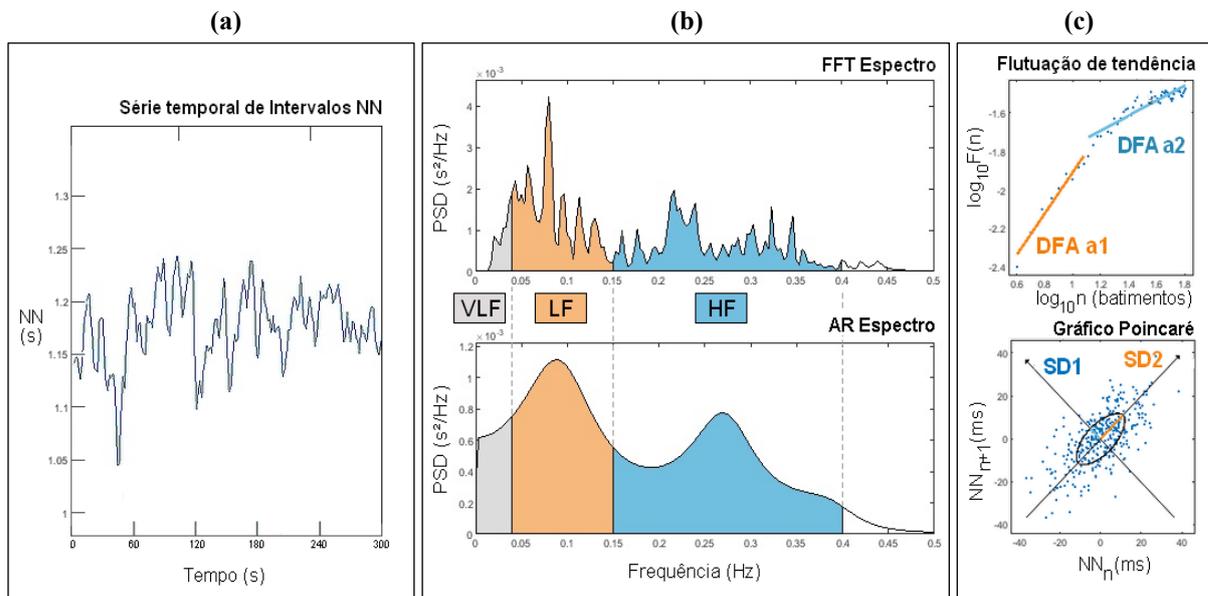
A atividade cardíaca varia de ritmo continuamente ao longo do dia, e o nível de sensibilidade (capacidade) com que o coração é capaz de promover tal variação é chamado de variabilidade da frequência cardíaca (HRV – *Heart Rate Variability*) (BERNTSON et al., 1997; MALIK et al., 1996). Por exemplo, enquanto a realização de atividade física exige aceleração dos batimentos para entregar mais O₂ e nutrientes às células, momentos de digestão e repouso demandam menor suplementação energética, conseqüentemente, menor bpm. Não apenas nesses momentos, mas o ritmo cardíaco permanece variando a todo instante para responder também às pequenas, porém, importantes alterações fisiológicas do organismo, como o inspirar e o expirar. A HRV é, portanto, um sinal que descreve as oscilações entre batimentos cardíacos consecutivos; um reflexo da capacidade do SNA em exercer mudanças finas e rápidas no SCV para garantia da homeostase (BERNTSON et al., 1997; MALIK et al., 1996; RAJENDRA ACHARYA et al., 2006; SHAFFER; GINSBERG, 2017).

O sinal da HRV é uma série temporal composta pelos intervalos de tempo entre batimentos cardíacos sucessivos, mensurado pelo tempo entre os picos R de cada complexo QRS do sinal de ECG (ver Figura 8) e descritos geralmente em ms (milissegundos). Em outras palavras, o sinal de HRV corresponde ao inverso da série temporal da FC. Contudo, para análise correta da HRV, o sinal deve conter apenas intervalos de batimentos com origem sinusal (Nó SA), *i.e.*, deve-se excluir batimentos irregulares (ectópicos) como extrassístole ou contração ventricular prematura. Dessa forma, o sinal de HRV é formado por uma sequência de intervalos RR normais, chamados de intervalos NN (SHAFFER; GINSBERG, 2017).

A série da HRV pode conter períodos tão longos quanto 24 h de monitoramento da atividade cardíaca (*long-term* HRV) ou curtos para ECG de 60 min, 30 min ou até mesmo 5 min de coleta de dados (*short-term* HRV). Enquanto a *long-term* HRV avalia o comportamento cardiovascular durante a realização de atividades corriqueiras e ao longo do dia (abrangente), a *short-term* HRV pode ser aplicada de duas formas distintas: (1) a coleta é feita com o paciente deitado e em repouso cujo objetivo é averiguar apenas as oscilações de nível basal (metodologia mais comumente empregada) ou (2) coletada durante/após a execução de alguma manobra (por exemplo, teste de esteira ou teste ergométrico) cujo objetivo é avaliar as respostas cardiovasculares ao estímulo (esforço) ou as oscilações durante a recuperação (MALIK et al., 1996; RAJENDRA ACHARYA et al., 2006; SHAFFER; GINSBERG, 2017).

Em termos de análise, a HRV pode ser analisada através de métodos lineares, no domínio do tempo ou no domínio da frequência, ou de métodos não-lineares. A análise linear no domínio do tempo avalia medidas estatísticas e geométricas da série temporal de intervalos NN, como média, desvio padrão e índices derivados de histograma (geralmente em escala discreta de 7,8125 ms [128 Hz]). Por sua vez, o método linear no domínio da frequência decompõe e quantifica, em termos de densidade de potência, por meio da técnica de transformada rápida de Fourier (FFT – *Fast Fourier Transform*) e/ou autorregressão (AR), as componentes espectrais do sinal de HRV (RAJENDRA ACHARYA et al., 2006; SHAFFER; GINSBERG, 2017). A Figura 12 ilustra um exemplo de *short-term* HRV de 5 min coletada com o paciente em repouso e os gráficos resultantes das análises descritas em (a) e (b).

Figura 12 – Exemplo de *short-term* HRV de 5 min no repouso: (a) série temporal de intervalos NN para análise linear no domínio do tempo; (b) decomposição espectral da série em bandas de frequência por meio das técnicas de FFT e AR para análise linear no domínio da frequência; e (c) gráficos de flutuação de tendência e Poincaré para análise não-linear.



Fonte: Elaborado pelo Autor no Kubios®.

Software Kubios (*Biosignal Analysis and Medical Image Group, Department of Physics, University of Kuopio, Finland*); HRV: *heart rate variability*; FFT: *Fast Fourier Transform*; AR: *autorregressão*; VLF: *very low frequency*; LF: *low frequency*; HF: *high frequency*; NN: *intervalo NN*; NN_n: *intervalo NN atual*; NN_{n+1}: *intervalo NN consecutivo do atual*; PSD: *power spectrum density*; DFA α1: *detrended fluctuation analysis 1*; DFA α2: *detrended fluctuation analysis 2*; SD1: *Poincaré plot standard deviation 1*; SD2: *Poincaré plot standard deviation 2*.

A vantagem do domínio da frequência sobre os demais métodos é a visualização do balanço simpático-parassimpático refletido sobre as bandas de frequência, de modo que: (1) banda de alta frequência (HF – *High Frequency* [0,15–0,4 Hz]) corresponde a modulação

respiratória e atuação do SNP sobre o coração; (2) banda de baixa frequência (LF – *Low Frequency* [0,04–0,15 Hz]) corresponde à ação geral do SNA com predomínio do SNS; e (3) banda de frequência muito baixa (VLF – *Very Low Frequency* [$< 0,04$ Hz]) corresponde à atuação do SNS sobre o coração (MALIK et al., 1996; RAJENDRA ACHARYA et al., 2006; SHAFFER; GINSBERG, 2017). No caso da VLF, é recomendado utilizá-la apenas se o sinal possuir mais de 256 intervalos NN, pois resolução baixa pode gerar perda de informação importante (MALIK et al., 1996). Por fim, existe ainda a chamada banda de ultra baixa frequência (ULF – *Ultra Low Frequency* [$\leq 0,004$ Hz]), porém a mesma só pode ser avaliada adequadamente em registros de *long-term HRV* (alta resolução) (SHAFFER; GINSBERG, 2017).

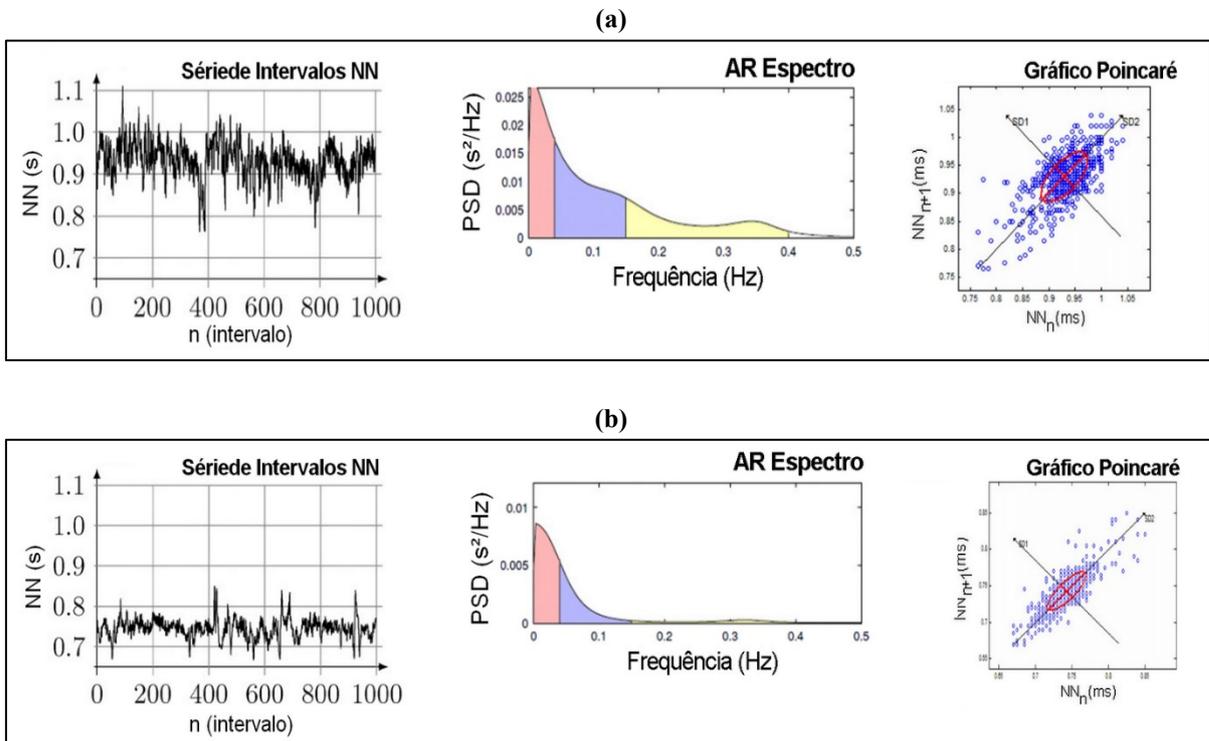
Por fim, os indicadores não lineares medem a previsibilidade/imprevisibilidade da série de intervalos NN por meio da análise de flutuações de tendência (DFA – *detrended fluctuation analysis*), nível de correlação de intervalos NN sucessivos (SD1 e SD2 do gráfico de Poincaré) e nível de entropia (RAJENDRA ACHARYA et al., 2006; SHAFFER; GINSBERG, 2017). A Figura 12 (c) ilustra gráficos da análise não-linear. Dentre as técnicas, a DFA é uma abordagem aplicada para avaliar oscilações periódicas, aleatórias e estruturas fractais presentes na FC que descrevem processos fisiológicos sobre o SCV. Em condições basais, valores de DFA $\alpha 1$ próximos de 1,0 indicam balanceamento de curto prazo saudável da série de FC, enquanto valores distantes de 1,0 refletem perda de oscilação periódica e complexidade: valores decrescentes indicam maior aleatoriedade e desorganização, e valores crescentes indicam comportamento mais padronizado e pouca variação (GRONWALD; ROGERS; HOOS, 2020).

Como a HRV reflete a capacidade do SNA exercer mudanças finas e rápidas no SCV, a análise da HRV permite avaliar a integridade das funções autonômicas cardiovasculares e detectar possíveis anormalidades no sistema, como por exemplo, a CAN. Diversos estudos e revisões têm mostrado e reafirmado a efetividade da *long-term HRV* e da *short-term HRV* na investigação da CAN (BHATI et al., 2019; CHESSA et al., 2002; FAUST et al., 2012; FRANÇA DA SILVA et al., 2016; LIN et al., 2017; METELKA et al., 2018; POP-BUSUI et al., 2017a; SPALLONE et al., 2011a; TANG et al., 2014; VINIK et al., 2018; ZIEMSEN; SIEPMANN, 2019).

O diagnóstico de CAN se dá pela avaliação e comparação dos índices de HRV a uma referência controle. A Figura 13 exemplifica três gráficos resultantes da análise de *short-term HRV* de 5 min no repouso de (a) um paciente saudável e (b) um paciente DM2 positivo para

CAN com idades e características físicas semelhantes. Comparando os dados, é possível observar significativa diminuição da (1) variação dos intervalos NN (análise linear no domínio do tempo), (2) densidade de potência (análise linear no domínio da frequência) e (3) correlação dos pares de intervalos NN sucessivos (análise não-linear) no paciente DM2 positivo para CAN, revelando enfraquecimento do controle autonômico cardiovascular naquele paciente.

Figura 13 – Exemplo de *short-term* HRV de 5 min no repouso: (a) paciente saudável e (b) paciente DM2 positivo para CAN.



Fonte: Adaptado de Faust et al. (2012).

HRV: heart rate variability; *AR*: autorregressão; *n*: número do intervalo NN; NN: intervalo NN; NN_{*n*}: intervalo NN atual; NN_{*n+1*}: intervalo NN consecutivo do atual; PSD: *power spectrum density*; SD1: *Poincaré plot standard deviation 1*; SD2: *Poincaré plot standard deviation*.

Visando ao uso clínico da HRV, o *European Society of Cardiology* em conjunto com o *North American Society of Pacing and Electrophysiology* (MALIK et al., 1996) investigaram e validaram os principais índices da análise linear. O Quadro 6 apresenta os índices no domínio do tempo e da frequência validados para o *short-term* HRV e os respectivos sistemas autonômicos quantificados por eles. Ademais, o quadro também apresenta alguns índices de análise não-linear da HRV que vêm sendo estudados e cada vez mais utilizados na pesquisa.

Quadro 6 – Índices lineares e não-lineares da *short-term* HRV e os respectivos sistemas nervosos autônomos quantificados.

Índice	Udd	Descrição	SNA
Análise Linear no Domínio do Tempo - Medidas Estatísticas			
NNm	ms	Média dos intervalos NN	geral
SDNN	ms	Desvio padrão da média dos intervalos NN	geral
pNN50	%	Porcentagem de intervalos NN consecutivos com diferença de duração > 50 ms	SNP
RMSSD	ms	Raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre intervalos NN consecutivos	SNP
Análise Linear no Domínio do Tempo - Medidas Geométricas			
TRI idx	-	Integral da densidade do histograma dos intervalos NN dividido pela sua altura	geral
TINN	ms	Largura da linha de base do histograma de todos os intervalos NN	Geral
Análise Linear no Domínio da Frequência			
TP	ms ²	Potência total: variância total da série NN ($\leq 0,4$ Hz)	geral
VLF	ms ²	Potência absoluta da banda de frequência muito baixa (< 0,04 Hz)	SNS
LF	ms ²	Potência absoluta da banda de frequência baixa (0,04–0,15 Hz)	SNS*
LFn	n.u.	Potência relativa da banda de frequência baixa = $LF / [TP - VLF] \times 100$	SNS*
HF	ms ²	Potência absoluta da banda de frequência alta (0,15–0,4 Hz)	SNP
HFn	n.u.	Potência relativa da banda de frequência alta = $HF / [TP - VLF] \times 100$	SNP
LF/HF	%	Razão de potência absoluta = LF / HF (balanço simpático-parassimpático)	
Análise não-Linear			
SD1	ms	Desvio padrão do gráfico de Poincaré perpendicular à linha de identidade	SNP
SD2	ms	Desvio padrão do gráfico de Poincaré ao longo da linha de identidade	SNS*
SD1/SD2	%	Razão de desvio = $SD1 / SD2$ (balanço simpático-parassimpático)	
SampEn	-	Entropia aproximada: valores baixos refletem regularidade da série NN e valores altos refletem sua complexidade.	geral
DFA $\alpha 1$	-	Análise de flutuação tendenciosa de curto prazo.	
DFA $\alpha 2$	-	Análise de flutuação tendenciosa de longo prazo.	

Fonte: Adaptado de Malik et al. (1996) e Shaffer e Ginsberg (2017).

* reflete ambos SNP e SNS, porém com predomínio do SNS. Udd: unidade de medida; SNA: Sistema nervoso autônomo; SNP: sistema nervoso parassimpático; SNS: sistema nervoso simpático; NNm: intervalo NN médio; SDNN: *standard deviation of all NN intervals*; RMSSD: *square root of the mean of the squares of differences between adjacent NN intervals*; pNN50: *percentage of successive intervals that differ by more than 50 ms*; TRI idx: *HRV triangular index*; TINN: *triangular interpolation of successive NN intervals*; TP: *total power*; VLF: *very low frequency*; LF: *low frequency*; LFn: *normalized low frequency*; HF: *high frequency*; HFn: *normalized high frequency*; SD: *Poincaré plot standard deviation*; SampEn: *sample entropy*; DFA $\alpha 1$: *detrended fluctuation analysis 1*; DFA $\alpha 2$: *detrended fluctuation analysis 2*.

2.3.2.1 A Short-term HRV sob efeito de perturbações fisiológicas

A utilização da *short-term* HRV no repouso é largamente reportada na literatura (AGELINK et al., 2001; CHEN et al., 2008; CHESSA et al., 2002; FAUST et al., 2012; FRANÇA DA SILVA et al., 2016; LIN et al., 2017; METELKA et al., 2018; SACRE et al., 2012a, 2012b; TANG et al., 2014; TANK et al., 2001; ZIEMSEN; SIEPMANN, 2019). Por outro lado, poucos trabalhos exploram a *short-term* HRV em condições de esforço ou sob efeito de recuperação (BHAGYALAKSHMI et al., 2007; BHATI et al., 2019; METELKA et al., 2018).

A preferência pela *short-term* HRV no repouso se dá pela facilidade de sua execução e coleta de dados, não necessitando execução de manobras de esforço – que poderiam limitar a participação de alguns pacientes – e evitando a presença de artefatos, como por exemplo, artefato de movimento (FRANÇA DA SILVA et al., 2016). Contudo, a HRV em condições de repouso reflete apenas informações autonômicas basais, *i.e.*, ela não mensura o controle dinâmico do SNA sobre o SCV, podendo fornecer dados restritos sobre a CAN (BHATI et al., 2019). Evidências científicas sugerem que o sistema nervoso autonômico é mais responsivo durante perturbações fisiológicas (MICHAEL; GRAHAM; OAM, 2017); portanto avaliações em situações de esforço ou sob efeito de recuperação resultariam em diagnósticos mais exatos.

Com base no argumento anterior, Bhati et al. (2019) realizaram um estudo e mostraram que a *short-term* HRV de 5 minutos em condições pós-exercício ergométrico apresentou indicadores diagnósticos de CAN significativamente maiores que os da *short-term* HRV de 5 minutos no repouso: os índices NNm, SDNN, RMSSD, pNN50, TP, LFn, HF e LF/HF (apenas não LF e HFn) apresentaram acurácia diagnóstica maior na HRV pós-exercício comparado à HRV no repouso, sendo que o RMSSD ($p = 0,01$), o pNN50 ($p = 0,03$) e o TP ($p = 0,01$) mostraram diferenças significativas (BHATI et al., 2019). De acordo com os autores, embora a HRV no repouso seja uma abordagem mais viável pela facilidade de execução, a HRV sob efeito de perturbações fisiológicas resulta em diagnóstico de CAN mais conclusivo.

2.3.2.2 A Ultra-short HRV no repouso

Embora de grande valia diagnóstica, a HRV ainda é pouca explorada na rotina médica. O tempo demandado para a coleta, até mesmo das *short-term* HRV, é uma das principais barreiras para sua integração: “[...] a avaliação da HRV de 5 minutos é muito longa quando

comparada às medições rotineiras de glicose sanguínea, pressão sanguínea, temperatura corporal, frequência cardíaca, saturação de oxigênio e peso, feitas [em segundos] no consultório ou em casa” (SHAFFER et al., 2019, p. 215, tradução nossa). Visando à utilização mais rotineira da HRV, trabalhos mais recentes vêm explorando a técnica de HRV com tempos amostrais inferiores aos da *short-term*, períodos esses que variam entre 10 e 240 s, então denominada *ultra-short* HRV (ESCO; FLATT, 2014; JELINEK et al., 2017; MUNOZ et al., 2015; NARDELLI et al., 2018; PEREIRA et al., 2017; SHAFFER et al., 2019; SHAFFER; MEEHAN; ZERR, 2020; WEHLER et al., 2021).

Shaffer et al. (2019) investigaram janelas de *ultra-short* HRV no repouso mínimas necessárias para estimar os índices da já validada *short-term* HRV de 5 min no repouso (ver Quadro 6). Participaram da pesquisa 38 voluntários saudáveis (18-23 anos de idade). Os autores utilizaram o coeficiente de correlação de Pearson (r) com critério conservador ($r \geq 0,90$), aplicaram a técnica de limites de concordância (LOA – *limits of agreement*) de Bland-Altman com 95% LOA e usaram o teste-T de Student para confirmar a igualdade dos valores. Os resultados são apresentados no Quadro 7. De acordo com o estudo, a *ultra-short* HRV de 180 s foi capaz de estimar ($r \geq 0,93$), com 95% LOA, 16 dos 19 índices apresentados no Quadro 6 (as métricas VLF e TP não foram computadas pois algumas séries tiveram menos de 256 intervalos NN, e nenhuma informação foi dada a respeito do índice SD1/SD2). Posteriormente, os autores publicaram um trabalho de revisão (SHAFFER; MEEHAN; ZERR, 2020) onde descreveram a metodologia de investigação de confiabilidade (apresentada acima) para melhor guiar trabalhos futuros de *ultra-short* HRV.

Quadro 7 – Períodos de tempo mínimo necessários capazes de estimar os valores dos índices de *short-term* HRV de 5 min no repouso com coeficiente de correlação de Pearson $\geq 0,9$ nos estudos de Shaffer et al. (2019).

Período de tempo mínimo	Índices de <i>short-term</i> HRV de 5 min no repouso
10 s	NNm
60 s	pNN50, RMSSD, SDNN
90 s	TINN, LF, SD1, SD2
120 s	TRI idx, DFA $\alpha 1$
180 s	LFnu, HF, HFnu, LF/HF, DFA $\alpha 2$, SampEn

Fonte: Adaptado de Shaffer et al. (2019) e Shaffer, Meehan e Zerr (2020).

HRV: *heart rate variability*; NNm: intervalo NN médio; SDNN: *standard deviation of all NN intervals*; RMSSD: *square root of the mean of the sum of the squares of differences between adjacent NN intervals*; pNN50: *percentage of successive intervals that differ by more than 50 ms*; TRI idx: *HRV triangular index*; TINN: *triangular interpolation of successive NN intervals*; LF: *low frequency*; LFnu: *normalized low frequency*; HF: *high frequency*; HFnu: *normalized high frequency*; SD: *Poincaré plot standard deviation*; SampEn: *sample entropy*; DFA $\alpha 1$: *detrended fluctuation analysis 1*; DFA $\alpha 2$: *detrended fluctuation analysis 2*.

Em relação a CAN, Jelinek et al. (2017) mostraram que janelas curtas de até 10 s de ECGs registrados em condições aleatórias foram capazes de mostrar diferenças significativas de LF e HF entre indivíduos saudáveis e pacientes em estágio inicial de CAN (subclínica). Os autores, entretanto, não examinaram a confiabilidade dos índices.

Mais recentemente, Wehler et al. (2021) publicaram um estudo no qual avaliaram a confiabilidade da *ultra-short* HRV no repouso na investigação e diagnóstico da CAN. Os autores avaliaram as janelas de 10, 20, 30, 60, 90 e 150 s de *ultra-short* HRV na estimativa dos valores dos índices RMSSD, SDNN, LF e HF da *short-term* HRV de 5 min no repouso. Participaram da pesquisa 11 pacientes com diagnóstico positivo para CAN ($67 \pm 11,9$ anos de idade) e 76 voluntários com diagnóstico negativo para CAN ($59,4 \pm 12,1$ anos de idade). De acordo com o estudo, os índices RMSSD e HF apresentaram coeficiente de correlação de Spearman (ρ) – análise não-paramétrica – muito forte ($\rho \geq 0,8$) para *ultra-short* HRV ≥ 20 s, enquanto os índices SDNN e LF apresentaram correlação muito forte em janelas ≥ 60 s.

Analisando somente a janela de 60 s, os quatro índices investigados apresentaram $\rho \geq 0,84$ e viés mediano $\leq 1,09$ (9%) para 95% LOA de Bland-Altman, confirmando, assim, a confiabilidade dos índices de RMSSD, SDNN, LF e HF da *ultra-short* HRV ≥ 60 s como ferramenta para avaliação da CAN. Vale ainda destacar que, para a *ultra-short* HRV de 150 s, os coeficientes foram $\rho \geq 0,94$ e viés mediano $\leq 1,02$ (2%) (WEHLER et al., 2021).

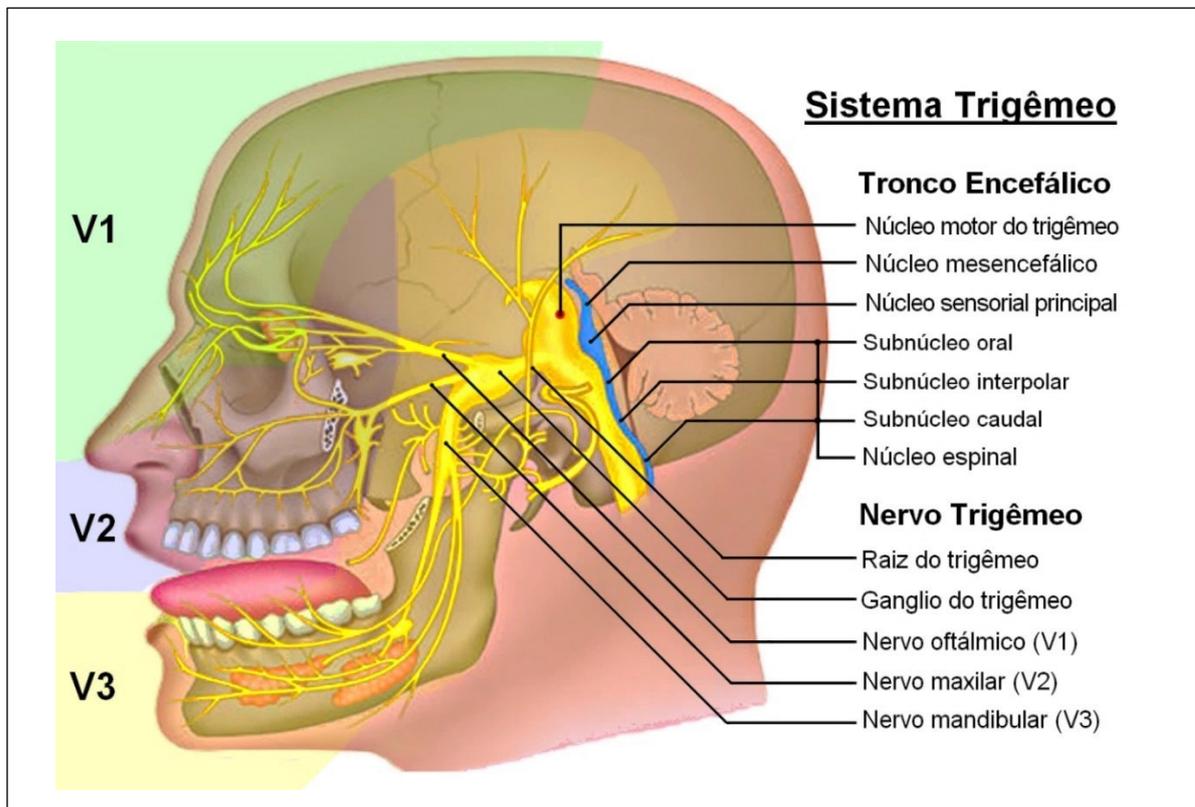
2.4 SISTEMA TRIGÊMEO – NERVO TRIGÊMEO E TRONCO ENCEFÁLICO

O sistema trigêmeo é a parte do sistema nervoso formada pelo nervo trigêmeo e pelos centros processadores/transmissores localizados no tronco encefálico; um sistema misto, formado por componentes somatossensoriais (maior) e motor somático (menor). A parte sensorial tem função de transmitir informações de tato (mecanorreceptores), de temperatura (termorreceptores) e de dor (nociceptores) originadas na pele da face e nas mucosas nasal e oral, e a parte motora de controlar os músculos da mandíbula e tensor do tímpano (KOEPPEN; STANTON, 2009; SPIRIEV; CHOWDHURY; SCHALLER, 2015). A Figura 14 ilustra o sistema trigêmeo e as áreas de inervação.

O nervo trigêmeo é o maior dos 12 nervos cranianos. Tem origem no nível médio da ponte por onde sai bilateralmente formando as raízes sensoriais e as raízes motoras do trigêmeo, viaja até a caverna de Meckel, na fossa craniana média, onde a divisão somatossensorial forma o gânglio do trigêmeo, e então divide-se em três ramos sensitivos: a divisão oftálmica (V1), a

divisão maxilar (V2) e a divisão mandibular (V3) – daí o nome trigêmeo. O ramo V1 integra as vias que inervam a parte anterior do couro cabeludo, a pele da frente (*i.e.*, testa), a pele da pálpebra superior, do nariz, a mucosa nasal, a córnea e as glândulas lacrimais; a V2 inerva a pele da bochecha, do lábio superior, da pálpebra inferior, da mucosa nasal, do palato e dos dentes superiores; e a V3 inerva a pele do mento (*i.e.*, queixo), a região temporal do couro cabeludo, a parte anterior da língua e os dentes inferiores (ver Figura 14) (LAPI, 2015; MARIEB; WIHELM; MALLATT, 2014; SPIRIEV; CHOWDHURY; SCHALLER, 2015; SUER, 2021).

Figura 14 – Sistema trigêmeo: nervo trigêmeo, núcleos do trigêmeo no tronco encefálico e áreas de inervação.



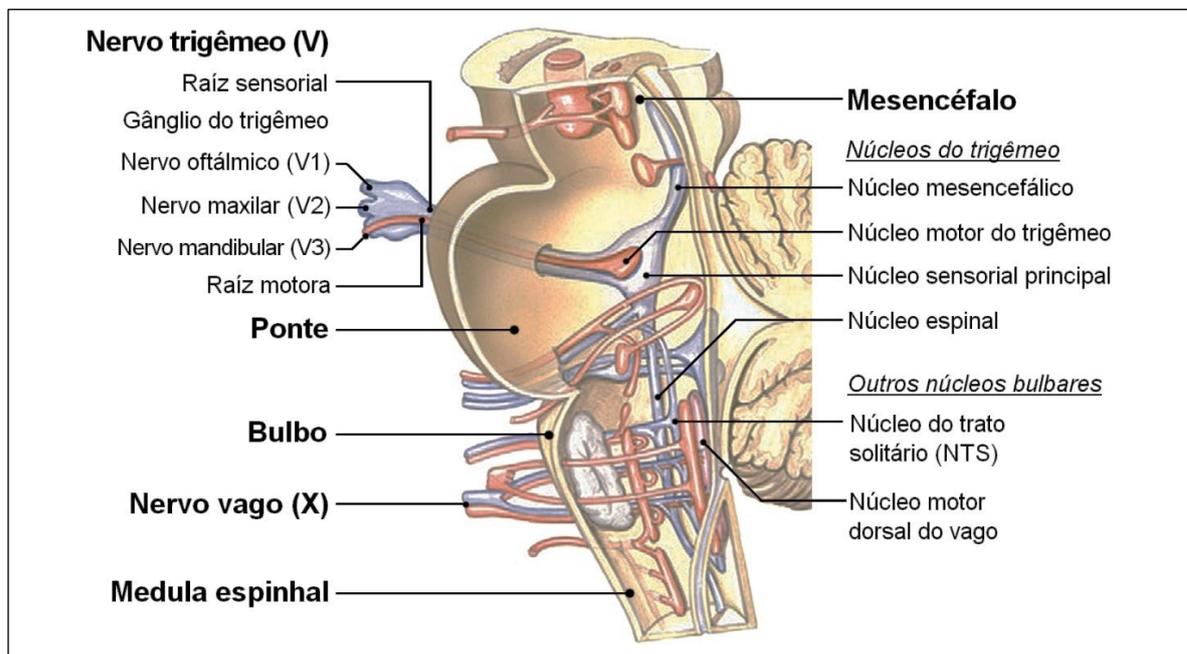
Fonte: Adaptado de Suer (2021, p. 6).

O nervo trigêmeo é o maior dos 12 nervos cranianos. Tem origem no nível médio da ponte por onde sai bilateralmente formando as raízes sensoriais e as raízes motoras do trigêmeo, viaja até a caverna de Meckel, na fossa craniana média, onde a divisão somatossensorial forma o gânglio do trigêmeo, e então divide-se em três ramos sensitivos: a divisão oftálmica (V1), a divisão maxilar (V2) e a divisão mandibular (V3) – daí o nome trigêmeo. O ramo V1 integra as vias que inervam a parte anterior do couro cabeludo, a pele da frente (*i.e.*, testa), a pele da

pálpebra superior, do nariz, a mucosa nasal, a córnea e as glândulas lacrimais; a V2 inerva a pele da bochecha, do lábio superior, da pálpebra inferior, da mucosa nasal, do palato e dos dentes superiores; e a V3 inerva a pele do mento (*i.e.*, queixo), a região temporal do couro cabeludo, a parte anterior da língua e os dentes inferiores (ver Figura 14) (LAPI, 2015; MARIEB; WIHELM; MALLATT, 2014; SPIRIEV; CHOWDHURY; SCHALLER, 2015; SUER, 2021).

Os corpos celulares dos receptores ficam localizados no par de gânglios do trigêmeo e seus processos centrais entram no tronco encefálico pelas raízes sensoriais do trigêmeo. A Figura 15 ilustra o tronco encefálico e a entrada do nervo. Três núcleos constituem a parte somatossensorial do sistema; eles são contínuos uns aos outros. O maior é o núcleo sensorial principal, localizado na parte dorsolateral da ponte, próxima à raiz do trigêmeo (ver Figura 14 e Figura 15). Esse núcleo recebe os aferentes de calibre mais grossos e seus neurônios respondem a estímulos mecanorreceptores de tato discriminativo (percepção fina) e vibração na pele da face e na mucosa nasal (KOEPPEN; STANTON, 2009; MARIEB; WIHELM; MALLATT, 2014; SPIRIEV; CHOWDHURY; SCHALLER, 2015; SQUIRE et al., 2008).

Figura 15 – Tronco encefálico: via de entrada do nervo trigêmeo (V), núcleos do trigêmeo, núcleo do trato solitário (NTS), núcleo motor dorsal do vago e nervo vago (X).



Fonte: Adaptado de Van Eijden et al. (2017, p. 23).

O núcleo do trato espinal do trigêmeo – ou simplesmente núcleo espinal – é o segundo centro somatossensorial do sistema; um centro alongado dividido em três subnúcleos: (1) o subnúcleo oral (*pars oralis*), localizado na região inferior da ponte e superior do bulbo; (2) o subnúcleo interpolar (*pars interpolaris*), na altura do óbex; e (3) o subnúcleo caudal (*pars caudalis*), na região inferior do bulbo e nos dois primeiros segmentos cervicais da medula espinhal (ver Figura 14 e Figura 15) (MARIEB; WIHELM; MALLATT, 2014). Suas fronteiras são dificilmente distintas, pois alguns aferentes inervam dois ou até mesmo os três subnúcleos ao mesmo tempo. Convencionalmente, o *pars oralis* é associado à transmissão da percepção tátil discriminativa da mucosa oral – ele é contínuo ao núcleo sensorial principal –, o *pars interpolaris* é associado às funções nociceptoras e termorreceptoras dos dentes e das mucosas, e o *pars caudalis* às funções nociceptoras e termorreceptoras da pele da face (KOEPPEN; STANTON, 2009; SPIRIEV; CHOWDHURY; SCHALLER, 2015; SQUIRE et al., 2008).

O terceiro núcleo somatossensorial do trigêmeo é o núcleo mesencefálico, localizado na região lateral da substância cinzenta periaquedutal no mesencéfalo (ver Figura 14 e Figura 15) (MARIEB; WIHELM; MALLATT, 2014). Este núcleo é composto por neurônios que dão origem a aferentes responsáveis por informações proprioceptivas da musculatura mastigatória (fuso muscular). Os processos centrais desses neurônios terminam em vários alvos, em especial, no núcleo motor do trigêmeo (único núcleo motor do sistema), responsável pelo movimento dos músculos da mastigação e tensor do tímpano (KOEPPEN; STANTON, 2009; SPIRIEV; CHOWDHURY; SCHALLER, 2015; SQUIRE et al., 2008).

Após receberem as informações, os núcleos somatossensoriais do trigêmeo dão origem a axônios que cruzam a linha média do tronco encefálico, ascendem pelo trato trigêmeo-talâmico e transferem as informações sensitivas para o núcleo ventral posteromedial do tálamo, então, os neurônios desse núcleo projetam-se para as áreas sensitivas da face no córtex cerebral (áreas SI e SII). Existem ainda as vias trigêmeo-cerebelares que transmitem as informações de tato e propriocepção dos núcleos do trigêmeo para o cerebelo (KOEPPEN; STANTON, 2009; LAPI, 2015; SQUIRE et al., 2008).

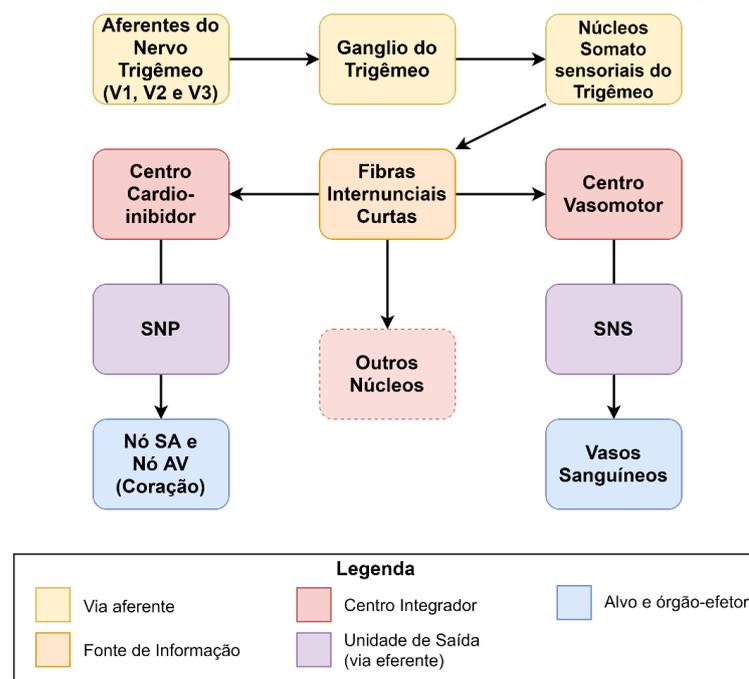
Além de transmitirem informações para processamento no sistema nervoso central, o sistema trigêmeo comunica-se com alguns centros de controle autonômico localizados no tronco encefálico, uma interligação que resulta nos chamados reflexos do trigêmeo.

2.4.1 Reflexos do Trigêmeo – O Reflexo Trigêmino-cardíaco (TCR)

Os reflexos do trigêmeo são respostas do tronco encefálico à estimulação de alguma parte do sistema trigêmeo. Diferentes locais de estimulação no sistema (receptores, vias, gânglio etc.) resultam em diferentes tipos de resposta e magnitude. Podem incluir perturbações hemodinâmicas repentinas (principal resposta), alterações respiratórias, mobilidade gástrica e contração esplênica (CHOWDHURY et al., 2015; MEUWLY et al., 2017a, 2017b; SCHALLER et al., 2009).

A Figura 16 resume o caminho neuronal para os reflexos do trigêmeo. Quando uma dada perturbação estimula alguma parte do nervo trigêmeo, ele dispara potenciais de ação para os núcleos somatossensoriais no tronco encefálico. Lá, os sinais são ligados por meio de conexões excitatórias e poli-sinápticas à formação reticular. Essa sequência de eventos é considerada a via aferente do reflexo (ARASHO et al., 2009; SCHALLER et al., 2009). Fibras internunciais curtas da formação reticular ligam os núcleos somatossensoriais aos neurônios pré-motores do reflexo; os principais são o núcleo ambíguo e núcleo motor dorsal do vago (*i.e.*, o centro cardioinibidor), o que estimula o tônus parassimpático cardíaco – principal resposta reflexa (CHOWDHURY et al., 2014, 2015).

Figura 16 – Resumo do caminho neuronal para os reflexos do trigêmeo.



Fonte: Adaptado de Chowdhury et al. (2014) e Spiriev et al. (2015).

V1: nervo oftálmico; V2: nervo maxilar; V3: nervo mandibular; SNS: sistema nervoso simpático; SNP: sistema nervoso parassimpático; SA: sinoatrial; AV: atrioventricular.

Além dos núcleos ambíguo e motor dorsal do vago, outros núcleos também são inervados, como por exemplo, os núcleos que compõem o centro vasomotor, resultando em modulação do tônus vascular cardíaco – vasodilatação ou vasoconstrição, a depender do tipo de reflexo do trigêmeo. Esta é a segunda principal resposta (CHOWDHURY et al., 2014, 2015).

Dados experimentais sugerem que os reflexos do trigêmeo são inicialmente e principalmente evocados pelos subnúcleos caudal e interpolar – *i.e.*, resposta às ativações nociceptoras e termorreceptoras (ver Figura 14) –, poucas respostas reflexas são mediadas pelo núcleo sensorial principal e subnúcleo oral (ativações mecanorreceptoras) e praticamente nenhuma resposta reflexa é evocada pelo núcleo mesencefálico (KUMADA; DAMPNEY; REIS, 1977).

Dentre os reflexos do trigêmeo, o chamado reflexo trigêmino-cardíaco (TCR – *Trigemino-cardiac Reflex*) é o mais discutido na literatura. Em geral, o TCR se manifesta como acentuada bradicardia, hipotensão e apneia (CHOWDHURY et al., 2015; MEUWLY et al., 2017a, 2017b; SCHALLER et al., 2009). Para muitos autores, na realidade, os reflexos do trigêmeo podem ser todos resumidos no TCR, dada a característica comum de causar bradicardia; assim, as demais variações reflexas do trigêmeo (de acordo com os pontos de gatilho do estímulo) seriam classificadas como subtipos do TCR (MEUWLY et al., 2015; SCHALLER et al., 2009).

Florian Kratschmer é considerado o primeiro estudioso a relatar a ocorrência do TCR, em 1870 (WIDDICOMBE; SANT'AMBROGIO, 1996). Embora na época não tenha definido o conceito de TCR, as respostas cardiovasculares e componentes respiratórios observados em seus estudos com animais serviram como base para a compreensão e definição do TCR em estudos posteriores (VAHDATI et al., 2015). No início dos anos 1900, um outro reflexo do trigêmeo, nomeado reflexo oculocardíaco, atualmente aceito como subtipo periférico do TCR, foi descrito por Aschner e Dagnini (BLANC et al., 1983). Outros pioneiros do TCR incluem Kumada e colegas, que descreveram a resposta vasodepressora do TCR (KUMADA; DAMPNEY; REIS, 1977); e Schaller e colegas, os primeiros a relatarem o subtipo central do TCR, observado durante neurocirurgias do ângulo pontocerebelar e do tronco encefálico (SCHALLER et al., 1999).

A partir dos estudos de Schaller et al. (1999), formou-se o conceito de TCR periférico e TCR central; remodelado mais tarde para TCR periférico, TCR do gânglio de Gasser e TCR central – classificação adotada atualmente pela comunidade científica (CHOWDHURY et al., 2015; MEUWLY et al., 2015). O Quadro 8 apresenta um resumo dessa classificação.

Quadro 8 – Os subtipos do reflexo trigêmeino-cardíaco.

	Periférico		Gânglio de Gasser	Central
	Reflexo oculocardíaco	Reflexo maxilo-mandibular		
Local	V1	V2 e V3	Gânglio	Entre o gânglio e o tronco
Tipo de estímulo	Pressão sobre os olhos, cirurgia ocular, trauma ocular	Redução de fratura	Ablação percutânea do gânglio	Tumores na base do crânio, aneurisma cerebral, cirurgias do ângulo pontocerebelar
FC	↓	↓	↓/↑	↓
PAM	↓/=	↓/=	↓/↑	↓
FR	↓/=	↓/=	↓/=	↓/=

Fonte: Adaptado de Chowdhury et al. (2014, 2015) e meuwly et al. (2015).

V2: divisão maxilar; V3: divisão mandibular; FC: frequência cardíaca; PAM: pressão arterial média; FR: frequência respiratória; ↑ aumento; ↓ diminuição; = sem alteração; /: ou.

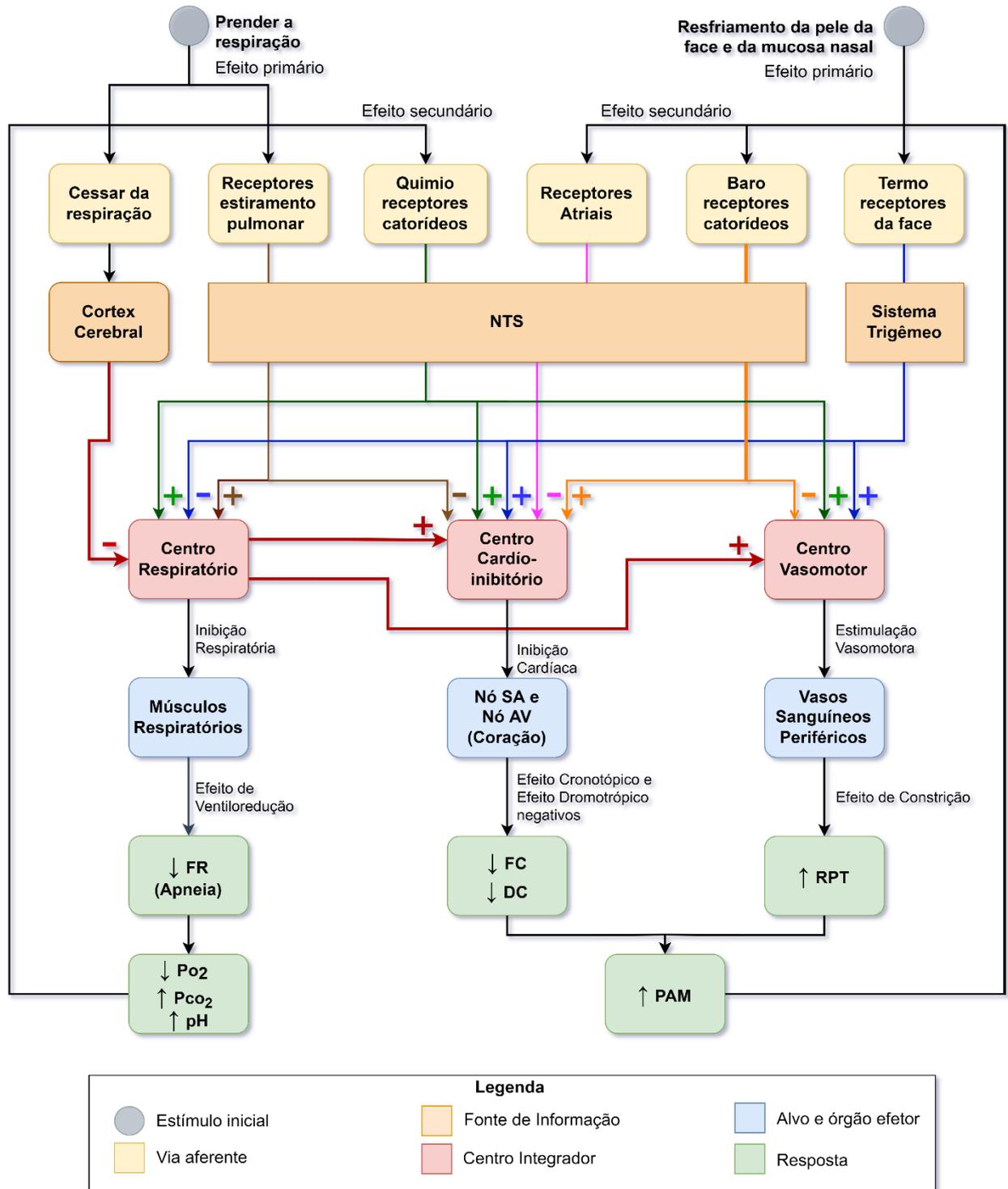
2.5 REFLEXO DE MERGULHO (DR)

O reflexo de mergulho (DR - *Diving Reflex*) é considerado uma reação fisiológica protetiva multissistêmica que ocorre em resposta à submersão da face em água. Alguns autores consideram o DR como o reflexo mais poderoso dos seres humanos. Ele envolve um vasto processo fisiológico de co-ativação parassimpática e simpática cujo resultado é bradicardia acompanhada do aumento da PA devido à forte elevação da RPT (FOSTER; SHEEL, 2005; GOODEN, 1994; HARDING; ROMAN; WHELAN, 1965).

As vezes referido como bradicardia de mergulho ou resposta ao mergulho, o DR foi descrito pela primeira vez em 1786 por Edmund Goodwyn; contudo, seu mecanismo fisiológico começou a ser melhor compreendido somente em 1870 após a publicação de trabalhos de Paul Bert a respeito da conservação de O₂ em patos durante o mergulho (VEGA, 2017). Ainda hoje, diversos estudos buscam obter maiores *insights* sobre os componentes e os mecanismos responsáveis pelo reflexo (FOSTER; SHEEL, 2005; LEMAITRE; SCHALLER, 2015; MEUWLY et al., 2015). Atualmente sabe-se que os mecanismos primários envolvem receptores e vias somatossensoriais do nervo trigêmeo, receptores e vias aferentes viscerais, vias eferentes do SNS e SNP e os órgão-alvos efetores do SCV (ARGACHA et al., 2008; FOSTER; SHEEL, 2005; GOODEN, 1994; HARDING; ROMAN; WHELAN, 1965).

A Figura 17 apresenta um fluxograma que resume os mecanismos envolvidos na evocação do DR, bem como os ajustes fisiológicos promovidos. Em seguida, segue uma descrição completa sobre cada mecanismo nos itens de 1 a 6.

Figura 17 – Componentes e mecanismos envolvidos na evocação do reflexo de mergulho: estímulos, receptores, vias neuronais e repostas fisiológicas.



Fonte: Adaptado de Foster et al. (2005) e Choate et al. (2014).

NTS: núcleo do trato solitário; FC: frequência cardíaca; DC: débito cardíaco; RPT: resistência periférica total; PAM: pressão arterial média; FR: frequência respiratória; PO₂: pressão parcial de oxigênio; PCO₂: pressão parcial de gás carbônico; + estimulação; - inibição; ↑ aumento; ↓ diminuição.

1 – Reflexo do trigêmeo: quando uma pessoa mergulha em água fria, seu rosto e nariz molham e se esfriam, estimulando termorreceptores (e nociceptores) do nervo trigêmeo que inervam a pele da face e a mucosa nasal (ver Figura 14) (GOODEN, 1994; SCHALLER et al., 2009). Alguns estudos sugerem que a estimulação das fibras que inervam a área paranasal e a mucosa nasal anterior (fibras ramificadas da divisão oftálmica [V1] do nervo trigêmeo) é o principal gatilho do DR (ver Figura 14) (MCCULLOCH, 2012; 2018; PANNETON, 2013). Uma vez ativados, os termorreceptores disparam potenciais de ação para os subnúcleos caudal e interpolar no tronco encefálico, onde as informações sensoriais são retransmitidas, via pequenos neurônios internúcleares, para o centro cardioinibitório, para o centro vasomotor e para o centro respiratório (setas azuis, Figura 17) que, por suas vezes, modulam o SNS e SNP (ver Figura 16) (KUMADA; DAMPNEY; REIS, 1977; SCHALLER et al., 2009). Como resultado, observa-se: (1) diminuição da FC (*i.e.*, bradicardia), (2) aumento da resistência vascular periférica (*i.e.*, vasoconstrição periférica) e (3) diminuição da frequência respiratória (FR) (*i.e.*, apneia). Esses três ajustes fisiológicos são coletivamente referidos como resposta ao mergulho (FOSTER; SHEEL, 2005; GOODEN, 1994; LEMAITRE; SCHALLER, 2015; MEUWLY et al., 2017b).

Alguns estudiosos acreditam que o DR seja um recurso filogenético adaptado para auxiliar os mamíferos na conservação de estoques de O₂ durante possíveis longos períodos de escassez (ALBONI; ALBONI; GIANFRANCHI, 2011; FOSTER; SHEEL, 2005; GOODEN, 1994; HARDING; ROMAN; WHELAN, 1965). Olhando por esse ângulo:

- a bradicardia – tônus parassimpático – reduz a frequência de bombeamento do coração para diminuir sua carga de trabalho e limitar o transporte e consumo de O₂ pelo organismo;
- a vasoconstrição periférica (aumento da RPT) – tônus simpático – busca redistribuir o fluxo sanguíneo priorizando órgãos vitais (como o cérebro, o coração, os pulmões, o fígado e os rins) e limitando o consumo de O₂ por grupos musculares não essenciais; e por fim
- a inibição do centro respiratório ocorre (acredita-se) pelo fato de a estimulação periférica do trigêmeo ser interpretada como presença de água próximo à boca e ao nariz, *i.e.*, a apneia seria uma resposta imediata do tronco encefálico para impedir o afogamento – segundo Hamilton e Mayo (1944), mesmo na submersão facial com *snorkel*, é necessário esforço consciente para vencer o reflexo e começar a respirar pela boca.

2 – Cessar a respiração: o ato de prender a respiração também desempenha papel importante no DR. Como apresentado antes, a estimulação dos termorreceptores do trigêmeo resulta em parcial inibição do centro respiratório (seta azul, Figura 17); todavia, o completo cessar da respiração devido à submersão da face em água ou pelo ato voluntário de prender a respiração causa inibição intensa do centro respiratório e estimula mais fortemente as atividades cardioinibitória e de vasoconstrição periférica (setas vermelhas, Figura 17) (CHOATE et al., 2014; FOSTER; SHEEL, 2005; GOODEN, 1994; LEMAITRE; SCHALLER, 2015).

3 – Receptores de estiramento pulmonar: o ato de prender a respiração (item 2), entretanto, gera também efeito sobre os receptores de estiramento pulmonar de adaptação lenta (FOSTER; SHEEL, 2005; MANLEY, 1990). Esses mecanorreceptores estão presentes nos músculos lisos das vias aéreas e são responsáveis por regular a FR. Se a respiração é cessada com volume pulmonar alto, os receptores de estiramento pulmonar são pressionados com mais força e isto causa um feedback negativo que atenua parte do efeito do cessar da respiração sobre o centro respiratório e cardioinibidor (seta marrom, Figura 17). Contudo, à medida que a duração da apneia progride ou caso a respiração tenha sido interrompida com volume pulmonar baixo, o feedback dos receptores fica reduzido ou até mesmo ausente, interferindo menos nos efeitos mediados pelo cessar da respiração (FOSTER; SHEEL, 2005; LEMAITRE; SCHALLER, 2015).

4 – Reflexo quimiorreceptor: os quimiorreceptores localizados nos corpos carotídeos e no arco da aorta desempenham um papel secundário importante para com os ajustes fisiológicos do DR (ARGACHA et al., 2008; FOSTER; SHEEL, 2005). Quando a FR é reduzida (ou cessada) não há troca adequada de O_2 e CO_2 . Com o tempo, a P_{O_2} arterial cai (*i.e.*, hipoxia) e a P_{CO_2} arterial aumenta (*i.e.*, hipercapnia), ativando mais os quimiorreceptores que então dão início ao reflexo quimiorreceptor (descrito no subtópico 2.2.3.3). Como resultado, ocorre indução adicional de bradicardia, vasoconstrição generalizada e estimulação do centro respiratório na tentativa de aumentar a FR para o organismo captar mais O_2 (setas verdes, Figura 17) (ALBONI; ALBONI; GIANFRANCHI, 2011; ARGACHA et al., 2008). Estudos com mergulhadores profissionais mostraram ainda que prender a respiração por períodos prolongados (> 1 min) ativa uma resposta secundária ainda mais robusta do reflexo quimiorreceptor, desencadeando intensa atividade cardioinibitória e forte vasoconstrição periférica (HEUSSER et al., 2009; RATMANOVA et al., 2016).

5 – Reflexo barorreceptor: os barorreceptores de alta pressão também desempenham efeito secundário no DR. A hipertensão consequente do aumento da RPT (devido ao

resfriamento da face, à inibição do centro respiratório e ao efeito da hipoxia/hipercapnia) é detectada pelos barorreceptores carotídeos e do arco da aorta e dá início ao reflexo barorreceptor (descrito no subtópico 2.2.3.1), aumentando a atividade cardioinibitória e reduzindo parte da atividade vasomotora geral na tentativa de abaixar a PAM (setas laranja, Figura 17) (FOSTER; SHEEL, 2005; LEMAITRE; SCHALLER, 2015).

6 – Reflexo paralelo de baixa pressão: por fim, os barorreceptores de baixa pressão também desempenham efeito secundário no DR. Contrariamente ao reflexo barorreceptor, o reflexo paralelo de baixa pressão (descrito no subtópico 2.2.3.2) atenua parcialmente o ajuste cardioinibidor em resposta à hipertensão (seta magenta, Figura 17) e promove vasodilatação apenas nos vasos sanguíneos renais, contribuindo de forma discreta em termos de RPT (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2005; FOSTER; SHEEL, 2005; GORDAN; GWATHMEY; XIE, 2015).

Conforme apresentado, resumidamente, o DR é resultado da combinação de (1) estimulação dos termorreceptores na pele da face e na mucosa nasal (reflexo do trigêmeo), (2) inibição intensa do centro respiratório devido ao cessar da respiração, (3) maior ou menor estimulação dos receptores de estiramento pulmonar devido ao cessar da respiração, (4) estimulação dos quimiorreceptores devido à hipoxia/hipercapnia (reflexo quimiorreceptor), (5) estimulação dos barorreceptores de alta pressão devido à hipertensão (reflexo barorreceptor) e (6) estimulação dos receptores atriais devido à hipertensão (reflexo paralelo de baixa pressão).

Ainda há muito debate quanto ao mecanismo primordial para evocação do DR: se é pela estimulação do trigêmeo ou pelo cessar da respiração (MEUWLY et al., 2017a). Estudos originais de Kumada e colegas (KUMADA; DAMPNEY; REIS, 1977) demonstraram que lesões bilaterais no NTS eliminaram completamente os efeitos do reflexo barorreceptor nos testes feitos, porém não foram capazes de bloquear a evocação do reflexo do trigêmeo. Tais observações são usadas como argumento por alguns autores para defender que o DR é mediado primeiramente pelo sistema trigêmeo e, posteriormente, intensificado pelo cessar da respiração e pelos mecanismos de efeitos secundários, pois tanto os mecanorreceptores do estiramento pulmonar quanto os quimiorreceptores e os barorreceptores de alta e baixa pressão são todos projetados para o NTS. Por outro lado, outros autores argumentam que somente com o cessar da respiração é possível obter respostas fisiológicas significativas para caracterizar os ajustes promovidos pelo DR (queda da FC \geq 20%) (CHOATE et al., 2014; FOSTER; SHEEL, 2005; GOODEN, 1994; LEMAITRE; SCHALLER, 2015; MEUWLY et al., 2017b).

2.5.1 A Relação do DR e do TCR

Conforme revelado em alguns estudos (CORNELIUS et al., 2010; SCHALLER et al., 2009), ambos o DR e o TCR são arcos reflexos trigêmeo-tronco encefálico induzidos pelos mesmos centros de controle e apresentam a bradicardia como principal manifestação clínica, sendo o DR acionado por estímulos que ocorrem na superfície da face e nas mucosas oral e nasal e o TCR acionado por estímulos ao longo do nervo trigêmeo (MEUWLY et al., 2015).

Diante dessa comparação, alguns autores têm classificado o DR como mais um dos subtipos do TCR, de modo que o DR seria o TCR acionado por estímulos que ocorrem além da região periférica (conforme classificação descrita no Quadro 8) (MEUWLY et al., 2015). Contudo, ainda há muito debate sobre essa suposição, uma vez que, embora haja similaridade parassimpática (bradicardia), há também grande disparidade quanto ao tônus simpático: enquanto o TCR se caracteriza por forte ativação do SNP acompanhado de inibição do SNS (o que resulta em hipo/normotensão), o DR se caracteriza por co-ativação de ambos os sistemas, o que causa aumento da RPT e, conseqüente, elevação da PAM (LEMAITRE; SCHALLER, 2015; MEUWLY et al., 2017a, 2017b). Tal resposta simpática se dá pela estimulação dos receptores periféricos do trigêmeo combinada aos demais mecanismos envolvidos na evocação do DR (apresentados na Figura 17).

Dessa forma, ao invés de classificar o DR como subtipo de TCR, parece ser mais correto posicionar o TCR abaixo do DR, como sendo um dos mecanismos para evocação do DR conforme discutido no início deste tópico.

2.5.2 Testes de Funções Autonômicas com base no DR – *Cold Face Test* (CFT)

Diversos testes são conduzidos diariamente na prática clínica com a intenção de avaliar as condições de saúde dos pacientes e investigar possíveis patologias. Alguns consistem em submeter os pacientes à realização de manobras que promovem tonicidade reflexa do SNS (como no teste pressórico ao frio [*cold pressor test*], teste de preensão manual [*handgrip test*] e teste de mudança ortostática); outros resultam em tonicidade reflexa do SNP (como no teste de respiração profunda e teste de manobra de Valsalva) – alguns desses testes são descritos no subtópico 2.3.1 (Testes de Reflexo Autonômico Cardiovasculares) (BERNARDI et al., 2011; EWING et al., 1985; REYNERS et al., 2000).

Diferente dos reflexos comumente utilizados nos testes, o DR tem se mostrado um reflexo capaz de ativar ambos os sistemas autônomos, *i.e.*, sem efeito de contra inibição (FOSTER; SHEEL, 2005; LEMAITRE; SCHALLER, 2015; MEUWLY et al., 2015). Ele é associado a uma queda considerável de FC – tônus parassimpático – e, ao mesmo tempo, uma forte vasoconstrição periférica – tônus simpático – que permanecem durante considerável período enquanto mantida a estimulação; mostrado ser único em sua capacidade de separar os efeitos da co-ativação parassimpática e simpática. Assim, o uso do DR como um teste clínico permitiria avaliar simultaneamente a função trigêmeo-vagal-cardíaca e a função trigêmeo-simpático-vascular periférica (ARIZA; BURGOS; FRATI, 1995; HEATH; DOWNEY, 1990; HILZ et al., 1999; KHURANA et al., 1980; KHURANA; WU, 2006; REYNERNS et al., 2000).

Contudo, a evocação do DR em sua forma natural (imersão facial completa em água fria) é uma manobra pouco utilizada para fins clínicos, dada a dificuldade de alguns pacientes executarem a manobra de modo estável (sem acrescentar viés ao exame) somada aos riscos de afogamento e de choques elétricos devido à manipulação da água junto a equipamentos eletromédicos (KHURANA et al., 1980).

Diante do desafio, Khurana et al. (1980) foram os primeiros estudiosos a explorarem um método de evocação do DR sem a necessidade de imersão facial em água, propondo, a partir dos resultados de seus experimentos, a utilização do então titulado teste de rosto frio (CFT – *Cold Face Test*). O CFT consiste na aplicação de algum material úmido e frio no rosto do paciente para ativação dos termorreceptores do nervo trigêmeo, de modo a mimetizar a ação da imersão facial em água fria, uma forma mais simples e segura de evocar o DR no ambiente clínico (HEATH; DOWNEY, 1990; KHURANA et al., 1980; REYNERNS et al., 2000).

Para testar e validar a melhor proposta, Khurana et al. executaram 4 protocolos em 50 voluntários saudáveis (gênero não informado) com idade média de 33 [19-85] anos e compararam diferentes formas de evocar o DR: (1) imersão facial em água fria com apneia, (2) CFT sem apneia, (3) CFT com apneia e (4) apneia apenas. Em 14 dos 50 voluntários, os pesquisadores avaliaram ainda o uso de compressas frias aplicadas somente sobre a região da face inervada pela divisão V1 do nervo trigêmeo; depois V2 e por fim V3 (ver referência na Figura 14). A métrica utilizada na análise foi comparar a FC mínima alcançada durante o DR com a FCb registrada nos 120 s antes da evocação do DR ([estímulo] – [repouso]). Os valores de FC foram medidos com o uso de um equipamento de ECG (KHURANA et al., 1980).

De acordo com o estudo, o CFT foi capaz de replicar a bradicardia característica do DR e, dentre os três testes que mimetizaram a evocação, o CFT sem apneia foi o teste que

apresentou maior coeficiente de correlação ($r = 0,55$) com o teste de imersão facial em água fria. Além disso, o CFT com apneia não resultou em bradicardia significativamente diferente ao CFT sem apneia ($p > 0,10$), sugerindo que não há necessidade de prender a respiração no CFT (em termos de bradicardia). Por fim, a estimulação de V1 apresentou resposta média significativamente maior quando comparado à estimulação apenas de V2 ($p < 0,01$) e de V3 ($p < 0,02$) (KHURANA et al., 1980), sugerindo o V1 ser o principal caminho para evocação do DR.

Para validação do CFT no diagnóstico de disfunções autonômicas, Khurana et al. experimentaram a imersão facial em água fria com apneia e o CFT sem apneia em 17 pacientes com diagnóstico positivo prévio de disfunção autonômica (7 pacientes DM, 4 com AVC, 3 com esclerose múltipla e 3 com síndrome de Shy-Drager) (KHURANA et al., 1980). De acordo com o estudo, ambos os DRs evocados via CFT e imersão facial em água fria foram incapazes de causar bradicardia nos 17 pacientes, revelando o potencial do CFT no diagnóstico da disfunção trigêmeo-vagal-cardíaca (KHURANA et al., 1980).

Dando sequência à validação do CFT, Heath e Downey (1990) (1) investigaram a contribuição da temperatura (0 °C, 5 °C, 10 °C e 15 °C) e do tempo de estimulação (20 s, 40 s, 60 s e 120 s) na evocação do DR, (2) reavaliaram o local de aplicação das compressas frias (bilateralmente em V1, V2 e V3; bilateralmente apenas em V1; e unilateralmente em V1, V2 e V3 – ver referência na Figura 14) e (3) analisaram a repetibilidade do CFT resultando, ao todo, em 12 testes experimentais. 16 voluntários saudáveis (9 mulheres) com idade entre 21 e 35 anos participaram do estudo. A FC e o fluxo sanguíneo periférico (FSP) foram as variáveis analisadas e em duas métricas diferentes: (1) a FC média e o FSP médio registrados durante o DR comparados, respectivamente, à FCb e ao FSP basal registrados por 120 s antes da evocação do DR; e (2) a FC mínima e o FSP mínimo alcançados durante o DR e comparados, respectivamente, à FCb e ao FSP basal. Os valores de FSP foram mensurados com o uso de um equipamento de fotopletismografia (PPG).

De acordo com Heath e Downey: a aplicação de compressas frias entre 0-5 °C gerou as maiores variações de FC ($p < 0,002$) e de FSP ($p < 0,001$), a duração de 40 a 60 s gerou as maiores variações médias de FC ($p < 0,05$) e de FSP ($p < 0,002$), e a aplicação do estímulo frio bilateralmente em V1, V2 e V3, (*i.e.*, em todo o rosto) resultou em respostas cardiovasculares estatisticamente mais significativas ($p < 0,05$) quando comparado à aplicação unilateral e à aplicação em V1 apenas, sugerindo que é melhor aplicar o CFT em toda a face. Entre as métricas empregadas, os autores sugeriram usar os valores mínimos alcançados, pois, conforme

mostrado no estudo, a comparação com valores mínimos resultou em médias amostrais com menor desvio padrão. Por fim, os autores comprovaram a repetibilidade do CFT ao averiguarem que não houve diferença estatística entre as variações de FC e de FSP observadas nos testes de repetibilidade (*setting*: estimulação de V1, V2 e V3; 0 °C; 60 s; e sem apneia). Concluindo, o CFT foi efetivo em avaliar a integridade da via trigêmeo-vagal-cardíaca, refletida nas respostas de FC, e a integridade da via trigêmeo-simpático-vascular periférica, refletida nas variações de FSP (HEATH; DOWNEY, 1990).

Em um estudo posterior, Trouerbach et al. (1994) propuseram a utilização de sacos plásticos de camada fina preenchidos com água e gelo para substituir as compressas frias usadas nos CFTs anteriores, de modo a permitir esfriamento mais rápido e prolongado do rosto. No experimento, os sacos foram posicionados por 30 s na região V1 em 10 homens saudáveis com idade média de $22 \pm 3,9$ anos. Os autores reavaliaram ainda a contribuição da apneia para com os ajustes fisiológicos do DR. Para a análise, os autores compararam a FC média registrada durante o DR com a FCb registrada 30 s antes do DR. Além da FC, valores de PAS e a PAD também foram comparados. As pressões foram mensuradas uma única vez antes e durante a execução da manobra por meio de um monitor de PA automático não invasivo. De acordo com o estudo, a utilização do saco plástico no CFT resultou em significativa queda de FC ($p < 0,01$) e a presença da apneia não acrescentou diferença significativa aos resultados (sustentando as observações anteriores de Khurana et al. (1980)). Com relação a PAS e a PAD, as medidas feitas em ambas as manobras, CFT com apneia e CFT sem apneia, não apresentaram diferença dos valores de base, mostrando que a mensuração unitária da PA é inefetiva na avaliação autonômica (TROUERBACH et al., 1994).

Em um outro estudo, Reyners et al. (2000) buscaram investigar a contribuição da massa (peso) do saco plástico preenchido com água e gelo (800 g, 1,100 g e 1,400 g) sobre o rosto de 10 voluntários saudáveis (4 mulheres) com idade média de 32 [21–54] anos. Os autores investigaram ainda a interferência do estímulo frio e pressão sobre os olhos e pálpebras – a presença do reflexo oculocardíaco (ver Quadro 8) – e avaliaram novamente a contribuição da apneia para com os ajustes fisiológicos do DR em 11 voluntários saudáveis (3 mulheres) com idade média de 30 [21–45] anos. Por fim, a reprodutibilidade do CFT também foi avaliada conduzindo testes em 3 dias com intervalos distintos.

Para análise dos resultados, Reyners et al. compararam a FC mínima alcançada durante o DR com a FC mediana registrada por 30 s 1 min antes da evocação do DR, e avaliaram a PA batimento a batimento registrada com o uso de um equipamento Finômetro. Como a pressão

varia muito batimento a batimento, os resultados foram expressos pela média de três valores sucessivos (*i.e.*, média móvel 3) (PAS₃ e PAD₃). A maior PAS₃ e a maior PAD₃ foram então comparadas respectivamente à PAS basal e à PAD basal registradas durante os 30 s antes do DR (REYNERIS et al., 2000).

De acordo com o estudo, ocorreram variações significativas ($p < 0,05$) de FC e de PA em todos os testes, mostrando que a análise da PA batimento a batimento é um instrumento eficaz para avaliação da função trigêmeo-simpático-vascular periférica. Quanto ao critério de peso, não foi observada diferença nas respostas cardiovasculares. Da mesma forma, nem o reflexo oculocardiaco nem o CFT com apneia interferiram na variação da PA. Por outro lado, o CFT com apneia resultou em queda consideravelmente maior da FC quando comparado ao CFT sem apneia, porém, não significativa ($p = 0,08$). Por fim, a reprodutibilidade mostrou-se mais baixa nos 2 primeiros dias de teste e aumentou no terceiro dia, sugerindo ser conveniente praticar o CFT antes de realmente realizar a coleta de dados (REYNERIS et al., 2000).

Diante dos experimentos apresentados, diferentemente da imersão facial em água, o CFT é um teste simples e de fácil administração, não requer necessariamente apneia e pode ser realizado com o paciente em decúbito dorsal, o que facilita a utilização de equipamentos de ECG, PPG, Finômetro entre outros. Além disso, por não demandar participação ativa do paciente, *i.e.*, não requerer a execução de manobras por parte do paciente (que deve apenas permanecer deitado em decúbito dorsal e sem se mexer durante o teste), o CFT se mostra uma ferramenta útil para avaliação de funções autonômicas em pacientes que apresentam limitações ou incapacidades físicas devido, por exemplo, a obesidade, idade avançada, amputação de membro, lesão ou doença, como artrite reumatoide.

Por fim, vale registrar que além do CFT outras formas de evocação do DR – como a própria imersão em água fria, com ou sem apneia, ou ainda o uso de jato de ar frio (ARGACHA et al., 2008) – também são metodologias utilizadas em pesquisa para explorar os ajustes cardiovasculares promovidos pelo DR.

2.5.3 Outras Utilidades do DR na Clínica e na Pesquisa Científica

Segundo relatos na literatura, tem-se utilizado o DR para tratar casos de taquicardia supraventricular paroxística (PSVT – *Paroxysmal Supraventricular Tachycardia*), condição caracterizada por uma taquicardia que se inicia e termina subitamente, com origem na parte superior do miocárdio ventricular (FERGUSON; DIMARCO, 2003; SMITH et al., 2012). A

rápida bradicardia reflexa e o aumento da refratariedade miocárdica induzidos pelo DR têm se mostrado úteis para minimizar ou até mesmo anular a PSVT (FERGUSON; DIMARCO, 2003).

A técnica para evocação do DR mais comumente empregada baseia-se na aplicação de bolsas de gelo sobre o rosto dos pacientes (SMITH et al., 2012), ou seja, um CFT. Ainda que não haja evidências científicas significativas para comprovar a efetividade do DR na cessação da PSVT, e já que até o presente momento não há nenhuma técnica amplamente aceita e comprovada para o seu tratamento, a utilização do DR por meio do CFT tem sido uma boa alternativa (SMITH et al., 2012).

Em termos de pesquisa científica, além de ser usado para avaliar condições de saúde, o CFT também tem sido usado para investigar hipóteses e explorar mais a fisiologia do corpo humano, como por exemplo: (1) se o tônus vasomotor periférico pode ser sustentado durante longos períodos de DR (SCHLADER et al., 2016), (2) se há diferença nos ajustes fisiológicos promovidos pelo DR quanto ao sexo e/ou quanto a realização de atividade física (PRODEL et al., 2018), (3) se a aplicação de estresse térmico (calor) nos membros do corpo, simultaneamente à evocação do DR, aumenta ou atenua as respostas cardiovasculares (SCHLADER et al., 2018), (4) qual o nível de contribuição do DR para o aumento do fluxo sanguíneo cerebral (ALSALAHY et al., 2020), entre outros.

2.5.4 Fisiopatologia relacionada ao DR

Embora o DR seja uma adaptação fisiológica intrínseca e que tem sido estudada para benefício da medicina, existe uma síndrome médica mais séria potencialmente associada a ele: a síndrome de morte súbita do lactente (SMSL) – crianças até 24 meses de vida (MATTURRI; OTTAVIANI; LAVEZZI, 2005; SINGH et al., 2016).

A associação da SMSL com o DR é explicada pela forma como o reflexo é evocado. A hipótese é que um bebê dormindo em decúbito ventral – barriga para baixo – poderia ter seu rosto (receptores do nervo trigêmeo) estimulado pelo travesseiro ou colchão, ativando o DR e fazendo a criança parar de respirar. Esta associação se dá pelo fato de que, conforme descrito no subtópico 2.4.1 (Reflexos do Trigêmeo), embora os reflexos periféricos do trigêmeo sejam evocados pela resposta às ativações nociceptoras e termorreceptoras, ele também ocorre em resposta a estimulação dos mecanorreceptores (pressão). Assim, a hiper-reatividade parassimpática do DR e a resposta cardiorrespiratória à hipóxia seriam as possíveis causas de

SMSL; contudo, ainda não há evidências científicas suficientes para determinar o fator de risco (MATTURRI; OTTAVIANI; LAVEZZI, 2005; PEDROSO et al., 2012; SINGH et al., 2016).

A literatura relata ainda a ocorrência de episódios de DR durante a realização de vários procedimentos cirúrgicos, neurocirúrgicos e odontológicos nas proximidades do nervo trigêmeo. Tais relatos, entretanto, descrevem características que se assemelham mais ao TCR que ao DR: estimulação direta no nervo trigêmeo (procedimentos invasivos), bradicardia, hipotensão, apneia e/ou hiper mobilidade gástrica que surge durante as intervenções médicas (CHOWDHURY; SCHALLER, 2016).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta os materiais e métodos utilizados no estudo, incluindo os procedimentos clínicos e a coleta de dados realizada, o processamento dos sinais e a seleção dos testes estatísticos para análise dos resultados.

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo preliminar de caráter descritivo e analítico do tipo transversal para investigar a utilidade clínica do DR na avaliação de funções autonômicas cardiovasculares e o desempenho diagnóstico da *ultra-short* HRV sob efeito do DR na detecção da CAN no DM2 em comparação com a população negativa para DM, ambas com diagnóstico negativo para doenças cardiovasculares graves.

3.2 LOCAL DO ESTUDO

O local do estudo é o Instituto de Cardiologia de Tupã, localizado no município de Tupã no interior do estado de São Paulo, sob a supervisão do médico cardiologista Dr. Marcelo Gesteira da Silva Cunha (CRM nº 57348-SP), responsável clínico deste estudo.

O Instituto de Cardiologia de Tupã é referência na região, atendendo principalmente pessoas dos municípios de Tupã, Bastos, Iacri, Herculândia, Quintana, Quatá e Pompeia. A equipe conta com médicos cardiologistas, vasculares, endocrinologistas e fisiatras; presta serviços de consulta médica e realização de exames para as populações da área de atendimento. Foi escolhido como local de estudo por:

- estar localizado no município de residência do autor deste trabalho, permitindo exercer parte do trabalho em home office devido a emergência de saúde global causada pela pandemia do SARS-CoV-2;
- diferentemente do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC/EBSERH), o Instituto de Cardiologia de Tupã não presta atendimento ambulatorial nem de internação, sendo um local seguro para recebimento dos participantes da pesquisa e realização das coletas de dados durante a pandemia do SARS-CoV-2; e

- de acordo com informação da equipe administrativa do instituto, diariamente são atendidos de 2 a 3 pacientes com diagnóstico de DM, população objeto deste estudo, o que facilita o recrutamento dos participantes.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi conduzido como parte do projeto “Metodologias para Avaliação da Função Autonômica aplicadas no Diagnóstico, Prevenção e Tratamento do Diabetes Mellitus” previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH/UFSC) através do parecer consubstanciado CAAE 43349021.1.0000.0121 registrado na Plataforma Brasil em 01/03/2021 sob o n.º 4.566.224 (ANEXO A).

Antes da realização dos procedimentos clínicos e coleta de dados, todos os participantes leram e assinaram duas vias do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B) no qual constam os detalhes dos procedimentos clínicos, os riscos e benefícios do estudo, além das questões legais que envolvem sua participação.

3.4 SEGURANÇA EM PESQUISA DURANTE A PANDEMIA DO SARS-COV-2

Este estudo seguiu todas as orientações contidas na carta circulante “Orientações para Condução de Pesquisas e Atividade dos CEP Durante a Pandemia Provocada pelo Coronavírus SARS-CoV-2 (Covid-19)”, de 09 de maio de 2020, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep) e demais diretrizes adotadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) visando a segurança dos participantes e dos próprios pesquisadores.

Sempre antes de receber um novo participante, foi feita desinfecção de todas as superfícies presentes na sala de atendimento, incluindo móveis e equipamentos. O autor-pesquisador utilizou todos os equipamentos de proteção individual (EPIs) necessários, descartáveis (luvas e máscaras) ou esterilizáveis (*face shield*), vestidos em uma sala controlada antes de entrar em atendimento.

Os participantes da pesquisa foram recebidos um de cada vez, acompanhados, se necessário, por no máximo uma pessoa. Antes de entrar na sala de atendimento, o participante teve sua temperatura corporal medida. Em seguida, foi questionado se apresentou sintomas de falta de ar, dor ou pressão no peito, tosse, febre, dores no corpo, cansaço demasiado, inflamação

na garganta ou perda de paladar ou olfato nos últimos 14 dias. O participante que apresentou temperatura $\geq 37,5$ °C ou relatou qualquer dos sintomas mencionados acima, teve sua participação imediatamente descontinuada da pesquisa.

Após finalizado o atendimento, foi feita nova desinfecção das superfícies e adequado descarte ou esterilização dos EPIs. A higienização das mãos dos pesquisadores foi feita antes e após utilização das luvas, bem como a higienização das mãos dos participantes foi feita antes e após a execução dos procedimentos. A higienização foi feita com produtos de limpeza hospitalar e, com exceção dos equipamentos médicos e do *face shield*, todos os materiais usados nos procedimentos foram materiais descartáveis, não ocorrendo reutilização por diferentes participantes.

3.5 POPULAÇÃO

A população foco deste estudo foram os pacientes DM2 do município de Tupã e região que fazem acompanhamento no Instituto de Cardiologia de Tupã.

Objetivou-se obter 40 participantes com diagnóstico positivo para DM2 para posterior formação dos grupos DMCAN- (pacientes DM2 negativos para CAN) e DMCAN+ (pacientes DM2 positivos para CAN). Objetivou-se ainda obter 20 participantes com diagnóstico negativo para DM e CAN para formação do grupo Controle.

3.5.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos todos os pacientes de ambos os sexos, de todas as cores e etnias, índice de massa corporal e faixa etária entre 40 e 75 anos com diagnóstico positivo para DM2 (de acordo com os critérios da Sociedade Brasileira de Diabetes – ver Quadro 10, APÊNDICE A) e tempo de duração do DM ≥ 5 anos. Para isso, sob a supervisão do responsável clínico, foram convidados consecutivamente pacientes do Instituto de Cardiologia de Tupã com diagnóstico positivo prévio de DM2. Para formação do grupo controle, foram incluídos consecutivamente voluntários com idade e características físicas semelhantes, porém, diagnóstico negativo para DM (ver Quadro 10). Todos os participantes tiveram que apresentar exames de glicose em jejum e de HbA1c dos três últimos meses para avaliação do controle glicêmico.

3.5.2 Critérios de Exclusão

De acordo com as recomendações do *Toronto Consensus Panel* (SPALLONE et al., 2011b) e da *Italian Society of Diabetology* (SPALLONE et al., 2011a), foram excluídos da pesquisa todos os participantes com diagnóstico positivo de alguma doença cardiovascular grave: doenças cardíacas isquêmicas, cardiomiopatias, doenças valvares significativas, doenças cardíacas congênitas, doença cerebrovascular ou hipertensão arterial sistêmica estágio II ou III de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2016). Foram excluindo também todos aqueles que apresentaram alguma doença infecciosa ou inflamatória crônica, insuficiência renal ou hepática crônica, hiper/hipotireoidismo não controlado, neoplasia ativa, desnutrição, gravidez ou implante elétrico (e.g., marcapasso e desfibrilador).

Ainda seguindo as recomendações (SPALLONE et al., 2011a, 2011b), no dia da coleta de dados, foram excluídos todos os participantes que praticaram atividade física vigorosa nas últimas 24 h ou atividade física moderada no prazo de 1 h antes do exame, que ingeriram álcool, cafeína, tabaco ou alimentos pesados 2 h antes da coleta de dados ou que apresentaram sintomas de hiperglicemia ou hipoglicemia no momento do atendimento. Durante o agendamento, foi solicitado aos participantes DM2 que fizessem bom controle da glicemia e que checassem o nível glicêmico antes de comparecer à coleta de dados.

Por fim, as entidades (SPALLONE et al., 2011a, 2011b) também recomendam solicitar aos participantes interromperem a administração de drogas psicoativas ou associadas à regulação do SCV no dia da coleta (como diuréticos, β -bloqueadores, α -bloqueadores, antagonistas de canais Ca^{2+} , antiarrítmicos, inibidores da enzima conversora da angiotensina, antagonistas do receptor da angiotensina II e ácido acetilsalicílico [aspirina]), uma vez que tais medicamentos influenciam funções autonômicas cardiovasculares e podem interferir no resultados dos exames. Contudo, como este estudo é de caráter preliminar e conduzido por um profissional não médico estudante de mestrado, os pesquisadores não viram a necessidade de submeter os participantes à interrupção dos medicamentos. A presença de respostas anormais nos exames dos pacientes que fazem uso desses medicamentos foi interpretada como indicativo de agravamento das comorbidades cardiovasculares ou ainda desregulação do nível medicamentoso, sugerindo a necessidade de consulta e realização de exames complementares junto ao profissional médico responsável para melhor ajuste, substituição ou até mesmo adição de outros medicamentos.

3.6 PROCEDIMENTOS CLÍNICOS E COLETA DE DADOS

Os participantes foram recebidos no Instituto de Cardiologia de Tupã entre os dias 17 de maio e 25 de junho de 2021, das 14:00 às 18:30 horas – para minimizar a influência do ritmo circadiano (EWING et al., 1991). Após checagem da temperatura corporal e questionamento quanto aos sintomas relacionados à Covid-19, os participantes foram encaminhados à sala de atendimento. A Figura 18 apresenta duas fotografias da sala concedida pelo Instituto de Cardiologia de Tupã para execução dos procedimentos clínicos e coleta de dados.

Figura 18 – Sala de atendimento para realização dos procedimentos clínicos: (a) vista anterior e (b) posterior.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

O TCLE (ANEXO B) foi apresentado ao participante. Após leitura, sanção de dúvidas e assinatura do documento, deu-se início aos procedimentos clínicos e coleta de dados. A primeira etapa envolveu preenchimento de informações básicas para identificação do participante, seguido por anamnese, questionário de atividade física e realização de exame antropométrico para triagem do participante. Após a aplicação dos critérios de exclusão, deu-se início ao procedimento experimental para coleta dos dados cardiovasculares – sempre na presença do responsável clínico. Detalhes de cada etapa seguem descritos nos subtópicos seguintes.

Vale relatar que todos os procedimentos (para todos os participantes) foram realizados no mesmo local, a temperatura ambiente foi controlada em 22,5–23,5 °C e a umidade relativa do ar em 50–70%. Os participantes foram atendidos um por vez, e cada atendimento durou 2 h em média com intervalo de 30 min para desinfecção e preparação da sala para o próximo atendimento.

3.6.1 Avaliação Inicial – Identificação, Anamnese e Exame Antropométrico

As informações básicas para identificação do participante foram preenchidas no Formulário de Avaliação Inicial (APÊNDICE B), incluindo nome, idade, sexo, cor/etnia e dados para contato. Em seguida, o participante foi submetido à anamnese e exame antropométrico e esses dados também foram registrados no Formulário de Avaliação Inicial.

A anamnese incluiu o tipo do DM, o tempo de diagnóstico do DM, o histórico de doenças cardiovasculares, de outras doenças, comorbidades, deficiências, lesões, atendimentos ambulatoriais, intervenções cirúrgicas, tratamentos, uso de medicamentos (pontual e controlado) e consumo de álcool e tabaco. O histórico familiar de DM e de doenças cardiovasculares também foi questionado.

O exame antropométrico incluiu medição da estatura, massa, circunferência abdominal, temperatura corporal e PA em condições basais (repouso). Para o exame, foram utilizados uma balança eletrônica antropométrica Welmy (modelo W200 A), uma fita métrica DM, um termômetro digital de testa Aiqura (modelo AD801) e um monitor de PA automático de braço Omron (modelo HEM-7122).

3.6.2 Questionário Global de Atividade Física (GPAQ)

Como o objetivo do trabalho é avaliar funções autonômicas cardiovasculares, foi interessante correlacionar os achados cardiovasculares aos relatos da prática de atividade física. Para medir o nível de atividade física do participante, foi utilizado o questionário global de atividade física GPAQ (*Global Physical Activity Questionnaire*) (ANEXO C) desenvolvido pela WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017) e validado em mais de 20 países, disponível em dez línguas para vigilância global em atividade física (ARMSTRONG; BULL, 2006; CLELAND et al., 2014; KEATING et al., 2019).

O GPAQ abrange vários componentes da prática física, como intensidade, duração e frequência das atividades, e avalia três domínios nos quais a atividade física é realizada: (1) atividade física ocupacional, (2) atividade física para transporte (deslocamento) e (3) atividade física no lazer (ARMSTRONG; BULL, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). O GPAQ tem-se mostrado uma ferramenta completa e contribuído para a estratificação de diversos riscos em saúde (KEATING et al., 2019).

3.6.3 Procedimento Experimental para Coleta dos Dados Cardiovasculares

3.6.3.1 Protocolo Experimental

O procedimento experimental para coleta dos dados cardiovasculares foi dividido em duas fases. Para padronizar a metodologia de coleta (e agregar maior qualidade aos dados) foi desenvolvido um procedimento operacional padrão (POP) para cada fase:

- Fase 1 – POP Testes de Referência (ANEXO D): execução e coleta de dados da bateria de CARTs conforme Protocolo O'Brien e da *short-term* HRV de 5 min no repouso, usados posteriormente como referência no diagnóstico de CAN e formação dos grupos.
- Fase 2 – POP DR-CFT (ANEXO E): execução de um CFT para evocação do DR e coleta dos dados cardiovasculares na condição de repouso (REP), sob efeito do reflexo de mergulho (DR) e durante a recuperação (REC), usados posteriormente na análise investigativa segundo os objetivos deste trabalho.

O POP Testes de Referência foi desenvolvido após revisão bibliográfica de procedimentos experimentais apresentados nos subtópicos 2.3.1 (Testes de Reflexo Autônomo Cardiovasculares) e 2.3.2 (Variabilidade da Frequência Cardíaca). Para este estudo, foi escolhido trabalhar com a *short-term* HRV devido a praticidade de executá-la junto à etapa de repouso dos CARTs (que dura 5 min) – coleta única para os dois testes.

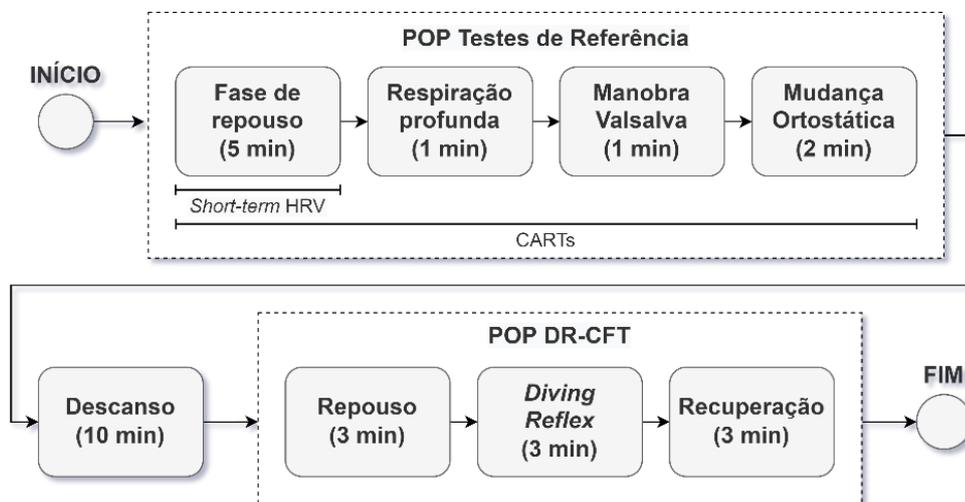
O POP DR-CFT foi desenvolvido tendo como referência os procedimentos experimentais revisados no subtópico 2.5.2 (Testes de Funções Autônomicas com base no DR – *Cold Face Test* (CFT)). Ele visa estimular os termorreceptores da face (áreas V1, V2 e V3 do nervo trigêmeo – ver Figura 14) em 0-5 °C por um período de 3 min e não demanda prender a respiração.

Antes de iniciar o procedimento experimental, foi feita familiarização do ambiente e dos equipamentos utilizados. Depois, foram dadas instruções quanto às fases, às etapas e às manobras a serem executadas; por fim, esclarecidas as possíveis dúvidas. O participante foi questionado se desejava ir à toailete e então solicitado que retirasse os acessórios metálicos. Com o participante já deitado, os equipamentos foram conectados e ligados. Antes da medição e coleta de dados, foi executado um procedimento teste, de forma a treinar as manobras e as

etapas de cada POP. Após 10 min de descanso (para o retorno fisiológico aos níveis basais), o procedimento experimental para coleta dos dados cardiovasculares foi executado.

A Figura 19 apresenta o esquema resumido do protocolo experimental. Todas as etapas do procedimento, os equipamentos e materiais utilizados e a preparação do participante seguem descritos em detalhes em cada POP (ANEXOS D e E). O procedimento iniciou-se com o POP Testes de Referência, seguido pelo POP DR-CFT. Entre as fases, foram respeitados 10 min de descanso para o retorno fisiológico aos níveis basais. Os participantes foram instruídos a relaxar e não se mover ou dormir durante as medições. Foram orientados também a respirar em ritmo basal e de forma contínua, sem prender a respiração ou inflar demais os pulmões.

Figura 19 – Esquema do protocolo experimental para coleta dos dados cardiovasculares.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

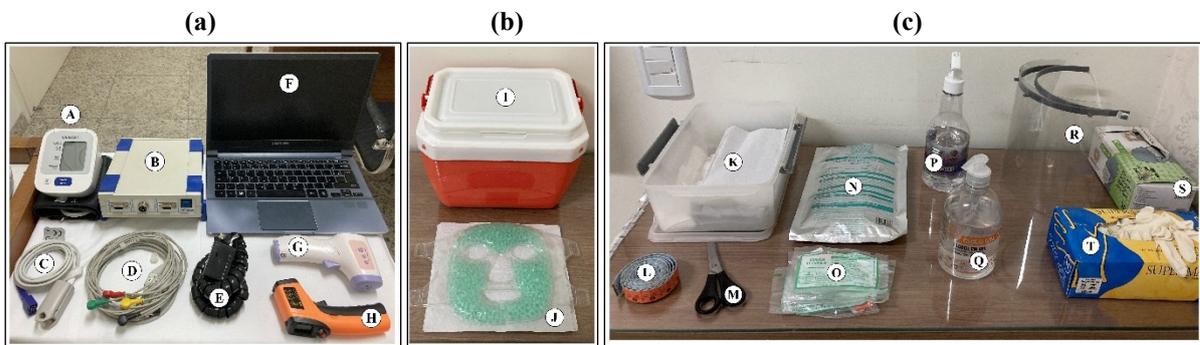
3.6.3.2 Materiais e Equipamentos

A Figura 20 apresenta os materiais e equipamentos utilizados.

Para a coleta dos dados cardiovasculares, foram usados um monitor de PA automático de braço Omron modelo HEM-7122 (Figura 20a A) e um equipamento AFTscan (*Autonomic Function Test Scanner*) desenvolvido pelo IEB-UFSC e a empresa InPulse Pnp Soluções em Bioengenharia LTDA (Figura 20a B). O AFTscan é um sistema que compõe hardware e software para registro do sinal de ECG e execução dos CARTs de acordo com o Protocolo O'Brien (ver Quadro 4). Ele permite diagnosticar a CAN de forma semiautomática com base no critério de pontuação composta (PC) previamente configurado no sistema (ver Quadro 5). Ele permite ainda exportar os dados coletados para posterior processamento e análise do sinal,

por exemplo, da HRV. O equipamento trabalha com frequência de amostragem de 500 Hz e dispõe de um módulo para PPG (Figura 20a C), um cabo para ECG de 3 derivações (Figura 20a D) e um módulo manômetro Valsalva (Figura 20a E) usado na manobra de Valsalva dos CARTs. Vale comentar que também foi feita coleta do sinal de PPG durante o procedimento experimental, porém o sinal não foi utilizado neste trabalho (a ser desenvolvido em trabalho futuro).

Figura 20 – Equipamentos e materiais utilizados nos procedimentos experimentais: (a) equipamentos para as medições e coleta de dados, (b) materiais para execução do CFT e (c) materiais de apoio para preparação do procedimento experimental.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

(A) monitor de pressão arterial automático de braço Omron modelo HEM-7122; (B) AFTscan (*Autonomic Function Test Scanner*) da InPulse; (C) módulo para fotopletismografia do AFTscan; (D) cabo para eletrocardiografia de 3 derivações do AFTscan; (E) módulo Valsalva do AFTscan – manômetro para Manobra de Valsalva; (F) computador laptop com software AFTscan instalado; (G) termômetro digital de testa Aiqura modelo AD801; (H) termômetro infravermelho industrial B-MAX; (I) bolsa térmica genérica; (J) máscara facial em gel Océane modelo adulto; (K) compressas de gaze e papel toalha; (L) fita métrica DM; (M) tesoura; (N) eletrodos de ECG descartáveis de Ag/AgCl; (O) sondas uretrais descartável 8 mm para uso como bocal no módulo Valsalva; (P) borrifador de álcool 70%; (Q) álcool em gel 70%; (R) face shield Arte Máxima modelo adulto; (S) máscaras cirúrgicas; e (T) luvas de látex.

Um computador laptop (Figura 20a F) com o software AFTscan versão 2018 3.3.3 foi usado para controlar o hardware AFTscan e registrar as medições via conexão USB. A Figura 21 apresenta a janela do software AFTscan e o sinal de ECG de 5 min do participante X coletado na etapa de repouso dos CARTs. Vale ressaltar que o AFTscan foi utilizado para coletar os sinais tanto no POP Testes de Referência quanto no POP DR-CFT.

No POP DR-CFT, foi escolhido trabalhar com uma máscara facial em gel da marca Océane modelo adulto (Figura 20b J), pois a mesma apresentou grande usabilidade para com o CFT destacando-se pela (1) qualidade de se manter em temperatura fria (0-5 °C) ao longo do

primeiro minuto de estímulo, (2) facilidade devido ao material gel em se ajustar aos contornos da face permitindo adequado posicionamento sobre a fronte, maxila e mandíbula para estimulação de V1, V2 e V3 (ver Figura 14), (3) praticidade por possuir abertura para o encaixe do nariz permitindo ao participante manter a respiração normalizada, (4) conveniência por possuir aberturas na região dos olhos permitindo evitar o reflexo oculocardíaco sobre o DR e (5) segurança, pois, por possuir a superfície lisa e em polietileno, permite fácil e efetiva esterilização após seu uso.

Figura 21 – Janela do software AFTscan versão 2018 3.3.3 com o ECG de 5 min no repouso do participante X.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Software AFTscan (InPulse Pnp Soluções em Bioengenharia LTDA, Florianópolis, Brasil).

A máscara foi guardada esterilizada em um saco plástico e mantida dentro do congelador de um frigobar do Instituto de Cardiologia de Tupã regulado a $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esse frigobar é dedicado ao armazenamento de medicamentos usados no instituto. Durante a etapa de repouso do POP DR-CFT, enquanto era registrado o ECG do participante no repouso (dados cardiovasculares basais), a máscara era retirada do congelador e do saco plástico e então submergida em uma mistura de água e gelo ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$) contida em um recipiente térmico (Figura 20b, I) para permitir adequada manutenção da temperatura de estimulação antes da máscara ser usada. Para evocação do DR, a máscara era então retirada do recipiente e colocada úmida e a

~0 °C sobre o rosto do participante. Um termômetro infravermelho industrial B-MAX (Figura 20a H) foi usado para mensurar a temperatura da máscara antes e ao final do estímulo.

Ademais, foram utilizados: um termômetro digital de testa Aiqura modelo AD801 para medir a temperatura do participante antes de iniciar o atendimento (Figura 20a G); compressas de gaze para higienização do local de fixação dos eletrodos e papéis toalha para secar o rosto do participante ao final da coleta de dados (Figura 20c K); uma fita métrica para medir a circunferência abdominal no exame antropométrico (Figura 20c L); uma tesoura para ajustar a sonda uretral no módulo Valsalva (Figura 20c M); eletrodos de Ag/AgCl descartáveis para ECG (Figura 20c N); sondas uretrais descartável 8 mm para uso como bocal no módulo Valsalva (Figura 20c O); um borrifador de álcool 70% para higienização das superfícies e esterilização da máscara ao final da coleta de dados (Figura 20c P); álcool em gel 70% para higienização das mãos (Figura 20c Q); e um *face shield* Arte Máxima modelo adulto (Figura 20c R), máscaras cirúrgicas (Figura 20c S) e luvas de látex (Figura 20c T) para proteção do pesquisador.

3.6.3.3 Diagnóstico de CAN – Fase 1

O diagnóstico de CAN foi dado de acordo com critério de Ewing-O'Brien (ver Quadro 5). Contudo, para a formação dos grupos, todos os pacientes considerados positivos para CAN, independentemente do nível (subclínico, estabelecido ou grave), foram colocados no grupo DMCAN+ (critério cauteloso).

Como a metodologia dos CARTs apresenta limitações no diagnóstico da CAN (referência no subtópico 1.1.4), índices de *short-term* HRV de 5 min no repouso foram usados para confirmar o diagnóstico. Neste estudo, escolheu-se trabalhar com os índices SDNN, RMSSD, LF e HF, quatro dos índices mais comuns na análise da HRV e com altas taxas de concordância na classificação da CAN (SACRE et al., 2012a, 2012b; WEHLER et al., 2021).

3.6.3.4 Métricas Investigativas de Interesse – Fase 2

No POP DR-CFT, fez-se aquisição do sinal de ECG de forma contínua ao longo dos 9 min do teste; entretanto, o CFT é dividido em três diferentes momentos (condições de coleta), são eles: repouso (REP), reflexo de mergulho (DR) e recuperação (REC), sendo que cada condição possui período de 180 s (3 min). Devido ao ato de aviso-colocação da máscara e ato de aviso-retirada da máscara (transição de condição com possível viés), os 5 primeiros e os 5

últimos segundos de cada condição foram descartados da análise, resultando em três janelas de 170 s no CFT.

Para avaliar a aplicação do DR e seu efeito nos participantes, foram analisadas as métricas FC média (FCm) e FC mínima (FCmin) nas três condições de coleta do CFT. Os dados foram analisados como valores absolutos e como mudança relativa do valor pré-resfriamento (*i.e.*, repouso [REP]) (Equação 4) para controlar possíveis diferenças basais entre os grupos. Conforme reportado por Heath e Downey (1990), a FC de pacientes saudáveis alcança valores mínimos cerca de 40 s após a aplicação do estímulo frio, então começa a retornar ao nível basal. Dessa forma, para avaliação da resposta rápida (saudável) à evocação do DR, adicionalmente foi incluída a condição DR40 às análises de FC. Enquanto as condições REP, DR e REC tem duração de 170 s, a condição DR40 tem duração de 40 s, período esse referente aos 40 primeiros segundos da condição DR. Complementarmente, também foi averiguada a Latência da FCmin alcançada na condição DR.

$$\Delta FCx (\%) = \left\{ \frac{FCx [condição] - FCx [REP]}{FCx [REP]} \right\} \times 100 \quad (4)$$

Além das métricas em FC citadas, também foi analisada a variável $\Delta Pico40$, nas formas absoluta (bpm) e relativa (%) (Equação 5). Enquanto a ΔFCm na condição DR40 permite avaliar a bradicardia média resultante nos 40 primeiros segundos de evocação do DR, a $\Delta Pico40$ permite avaliar o pico de bradicardia (pico de tônus parassimpático cardíaco) do paciente nesses 40 primeiros segundos.

$$\begin{aligned} \Delta Pico40 (pbm) &= FCmin [DR40] - FCm [REP] \\ \Delta Pico40 (\%) &= \left\{ \frac{FCmin [DR40] - FCm [REP]}{FCm [REP]} \right\} \times 100 \end{aligned} \quad (5)$$

Ainda avaliando o CFT, foram mensuradas a temperatura inicial (Tmi) e final (Tmf) da máscara e, ao final do procedimento experimental, os participantes foram questionados quanto à percepção de frio e dor durante o CFT, respondido conforme escala de Borg: de 0 (sem frio e dor) a 10 (frio e/ou dor máxima) (BORG, 1998).

Para investigar a utilidade do DR na HRV e o seu desempenho diagnóstico na avaliação de funções autonômicas cardiovasculares, foram analisados índices de *ultra-short* HRV sob o efeito do DR e índices de *ultra-short* HRV durante a recuperação do DR. Para

avaliar o desempenho desses índices, entretanto, foi necessário compará-los a valores de referência, neste caso, a valores coletados no repouso com período amostral semelhante. Assim, a *ultra-short* HRV foi processada nas três condições de coleta do CFT (REP, DR e REC), nas três janelas de 170 s.

De acordo com as observações de Shaffer et al. (2019) e de Wehler et al. (2021) apresentadas no subtópico 2.3.2.2 (A *Ultra-short* HRV no repouso), neste estudo, foi escolhido trabalhar com os índices de HRV no domínio do tempo, da frequência e índices não-lineares (ver Quadro 6) que apresentarem nível de confiabilidade (correlação e concordância) adequados conforme metodologia proposta por Shaffer, Meehan e Zerr (2020). Tal metodologia consiste em investigar se os valores da *ultra-short* HRV no repouso estão dentro de limites de concordância com os respectivos valores da *short-term* HRV no repouso e se eles apresentam correlação satisfatória (à escolha do autor). Detalhes desses e demais cálculos e a definição do limiar satisfatório são apresentados no Item 3.8 (ANÁLISE ESTATÍSTICA). Os índices TP e VLF não foram analisados pois algumas séries apresentaram menos de 256 intervalos NN.

3.7 PROCESSAMENTO DOS SINAIS

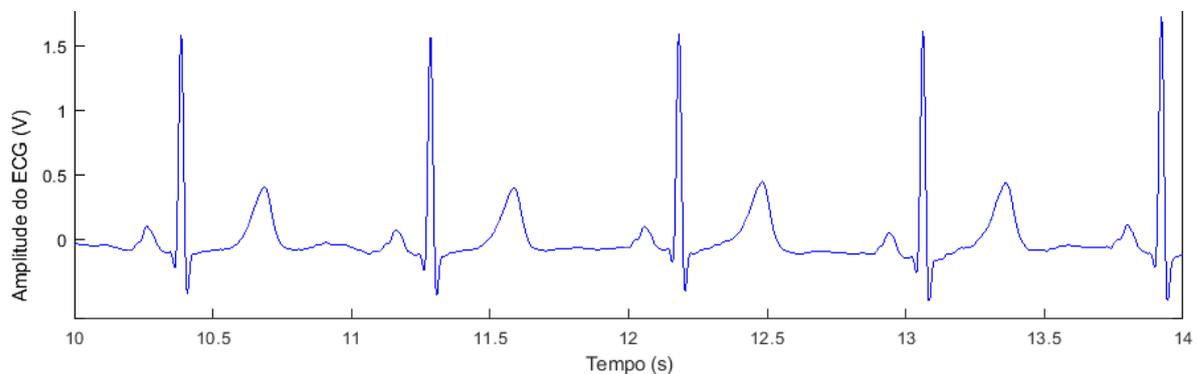
Após execução do procedimento experimental, os dados coletados foram conferidos.

Conforme apresentado anteriormente, o AFTscan é um sistema para execução dos CARTs de acordo com o Protocolo O'Brien e que diagnostica CAN de forma semiautomática. Assim, os resultados dos CARTs foram verificados e a classificação da CAN ajustada caso necessário (erro de automação). Em termos de HRV, o AFTscan não possui recursos para sua análise; assim, foi escolhido trabalhar com o software Kubios® HRV Standard versão 3.5.0 (Kubios Inc., University of Eastern Finland, Kuopio, Finlândia). Antes de utilizar o Kubios®, entretanto, foi escolhido fazer o pré-processamento dos sinais de ECG coletados pelo AFTscan e gerar as séries de intervalos NN.

O pré-processamento foi feito no software Matlab® versão R2013a (MathWorks Inc., Natick, MA, EUA). Os sinais de ECG de 5 min coletados na etapa de repouso do POP Testes de Referência (usados para a análise da *short-term* HRV de 5 min no repouso) e os sinais de ECG de 9 min coletados no POP DR-CFT (usados para as análises das três *ultra-short* HRV de 170 s no CFT), foram exportados do AFTscan em arquivos .csv e importados para o Matlab®. Foi selecionado trabalhar com a derivação DII do ECG conforme justificado no subtópico 2.1.3 (Eletrocardiograma (ECG)). Detalhes do pré-processamento seguem apresentados abaixo.

Inicialmente, os sinais foram reamostrados para 1 kHz pelo método de interpolação *spline* cúbica. Aumentar a frequência de amostragem elava a sensibilidade do modelo pois aumenta-se o número de amostras disponíveis para análise. Em seguida, foi aplicado um filtro Butterworth passa-faixa de 4ª ordem com frequências de corte em 0,5 Hz e 40 Hz para atenuação/retirada de ruídos e artefatos presentes no sinal. Foi escolhido trabalhar com a frequência de corte superior de 40 Hz pois o objetivo é apenas evidenciar as ondas e segmentos característicos do sinal de ECG para facilitar a detecção das ondas R – não é objetivo nosso avaliar os detalhes de maior ou menor frequência presentes no sinal (KAPLAN BERKAYA et al., 2018; NETO; SEISDEDOS, 2015). Além disso, a aplicação da frequência de corte de 40 Hz atenuou a componente fundamental da rede elétrica (60 Hz) e eliminou suas harmônicas, não havendo necessidade de utilizar filtros *notch*. A Figura 22 apresenta o sinal de ECG de 5 min do voluntário X coletado na etapa de repouso dos CARTs (POP Testes de referência) após ser reamostrado e filtrado.

Figura 22 – Sinal de ECG de 5 min do voluntário X no repouso reamostrado para 1 kHz e filtrado com Butterworth passa-faixa de 4ª ordem com frequências de corte em 0,5 Hz e 40 Hz.

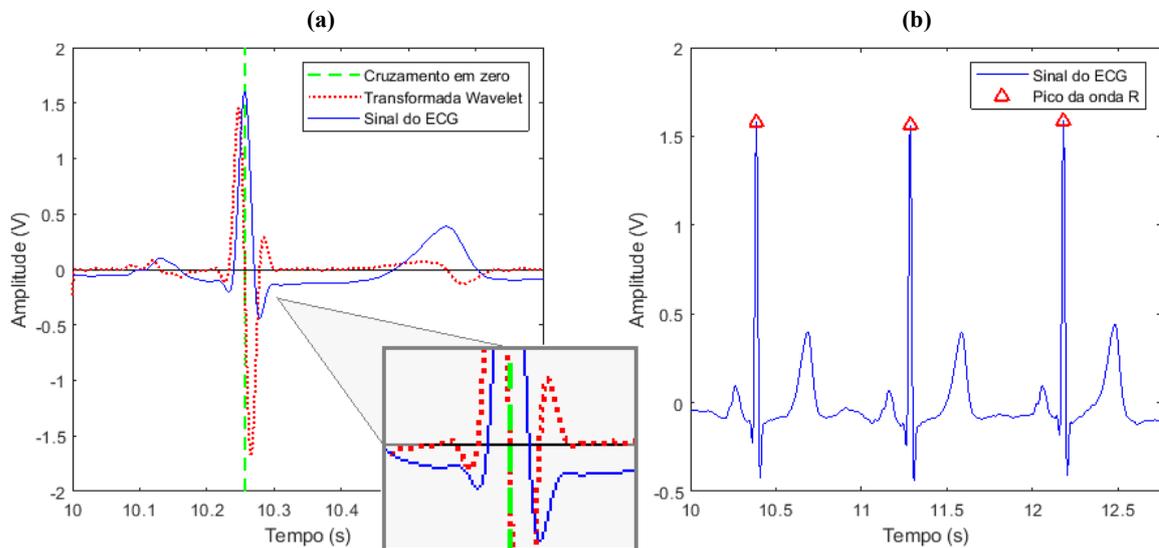


Fonte: Elaborado pelo Autor.

Para identificação das ondas e seguimentos, optou-se pela metodologia de filtros baseada na Transformada *Wavelet* (SAHAMBI; TANDON; BHATT, 1997). Essa técnica permite identificar as componentes do ECG de acordo com a banda de frequência característica de cada onda: a partir da convolução do sinal de ECG com a derivada de 1ª ordem de uma dada função gaussiana, os cruzamentos em zero no sinal resultante correspondem a pontos de máximo e mínimo locais do sinal de ECG; em outras palavras, diferentes escalas de *Wavelet* resultam em diferentes faixas passantes o que permite detectar singularidades de cada onda do ECG.

De acordo com Sahambi et al. (1997), para sinais com frequência amostral de 1 kHz, a derivada de 1ª ordem da gaussiana de escala 2^4 possui banda de frequência entre 4,1 e 16,2 Hz, faixa esta onde se encontra a maior parte da energia do complexo QRS. Assim, por meio da detecção do local de cruzamentos em zero do maior *turnover* da resultante da convolução, foi possível identificar o pico da onda R. A Figura 23 exemplifica o processo de Transformada *Wavelet* para identificação dos picos das ondas R do sinal de ECG do participante X.

Figura 23 – Processo de detecção dos picos das ondas R do sinal de ECG pelo método de Transformada *Wavelet*: (a) convolução do sinal de ECG com a derivada de 1ª ordem da gaussiana de escala 2^4 e (b) picos R detectados no ECG.



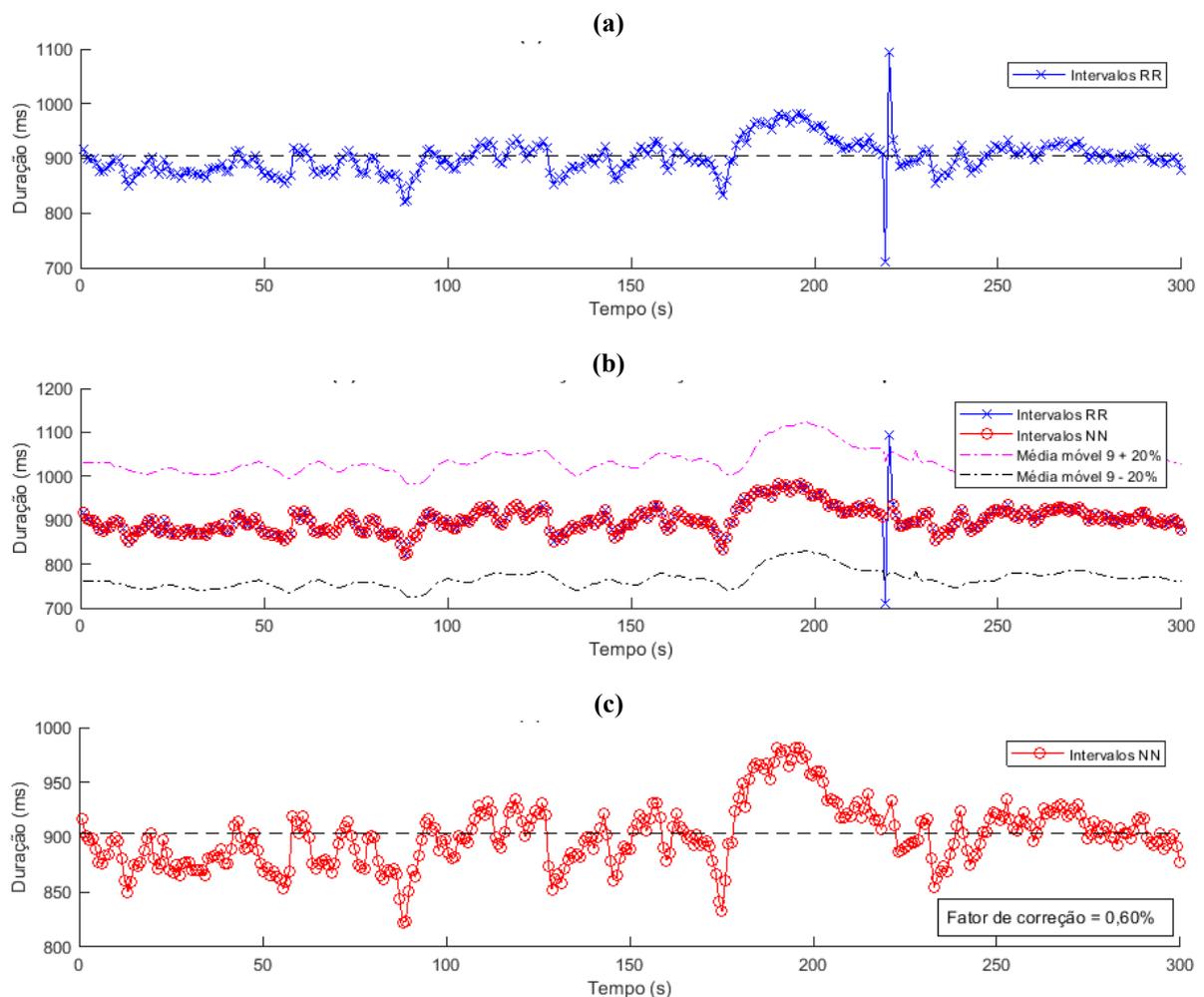
Fonte: Elaborado pelo Autor.

Uma vez detectados os picos, a série de intervalos RR foi obtida calculando-se a diferença de tempo entre cada par de ondas R consecutivas. A Figura 24.a apresenta a série de intervalos RR extraída do sinal de ECG de 9 min do voluntário X (POP DR-CFT). Conforme apresentado no subtópico 2.3.2, para análise da HRV, foi necessário ainda remover amostras discrepantes (batimentos ectópicos) presentes na série. Para isso, foram detectados os intervalos RR abaixo de 300 ms ($FC \geq 200$ bpm) e acima de 2000 ms ($FC \leq 30$ bpm) e os intervalos RR que divergem em mais de 20% da média dos 9 intervalos anteriores (média móvel 9), conforme metodologia proposta por Acar et al. (2000) ajustada para os nossos objetivos. A Figura 24.b exemplifica o processo de identificação dos batimentos ectópicos.

Após serem identificados pelo algoritmo, os batimentos considerados ectópicos foram avaliados pelos autores e então removidos gerando, por fim, as séries de intervalos NN como

exemplificado na Figura 24.c. Como este trabalho utiliza janelas curtas de 170 s, os voluntários que apresentaram fator de correção $(1 - [\text{intervalos NN}] / [\text{intervalos RR}]) \geq 0,05$ (5%) tiveram sua participação descontinuada da pesquisa. Por fim, as séries de intervalos NN foram exportadas do Matlab® e importadas para o Kubios®.

Figura 24 – Tratamento da série de intervalos RR extraída do sinal de ECG de 9 min do voluntário X: (a) a série de intervalos RR, (b) o processo de identificação e eliminação dos batimentos ectópicos e (c) a série de intervalos NN resultante.

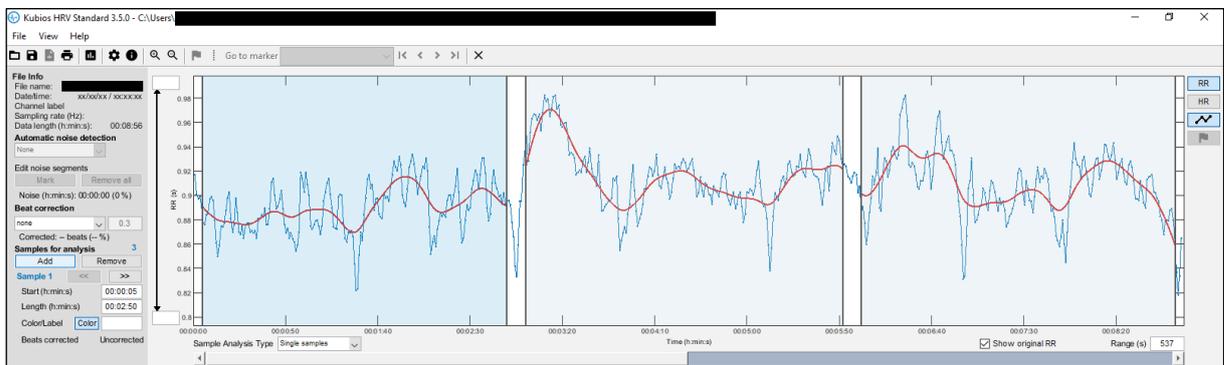


Fonte: Elaborado pelo Autor.

Devido à retirada de batimentos ectópicos, as séries de intervalos NN extraídas do ECG de 5 min (POP Testes de Referência) ficaram com duração de 296–300 s; assim, a janela da *short-term* HRV foi reajustada de 300 para 296 s e centralizada na série (para todos os participantes). Por sua vez, as séries de intervalos NN extraídas do ECG de 9 min (POP DR-CFT) ficaram com duração entre 534–540 s. Contudo, conforme justificado no subtópico

3.6.3.4, foi escolhido trabalhar com janelas de 170 s para análise da *ultra-short* HRV no CFT (três janelas); assim, um intervalo de 8–10 s foi ajustado entre cada janela, com 4–5 s entre as janelas e a borda de transição de cada condição do CFT (repouso [REP], reflexo de mergulho [DR] e recuperação [REC]). A Figura 25 exemplifica a formação das janelas para análise da *ultra-short* HRV no Kubios®.

Figura 25 – Formação das janelas de 170 s no software Kubios® HRV Standard versão 3.5.0: a série de intervalos NN extraída do ECG de 9 min do participante X e a separação das três janelas para análise da *ultra-short* HRV de 170 s no CFT.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Software Kubios® HRV Standard versão 3.5.0 (Kubios Inc., University of Eastern Finland, Kuopio, Finlândia).

Para a análise, as séries de intervalos NN foram reamostradas de 1 Hz para 4 Hz. Essa taxa de frequência é indicada para a análise da HRV pois permite calcular componentes de frequência abaixo de 1 Hz (sem distorção), além de estar ~8x acima da maior banda de interesse do SNA (HF: 0,15–0,4 Hz) – faixa que reflete a modulação parassimpática (SINGH; VINOD; SAXENA, 2004). Para decompor as séries temporais nas componentes de frequência, foi escolhido trabalhar com o método não-paramétrico da FFT com periodograma de Welch (para reduzir os ruídos na estimação da densidade de potência do espectro) (WELCH, 1967). A FFT foi escolhida devido a sua simplicidade, velocidade de processamento e por ser a principal escolha dentre os autores na literatura. Para o cálculo da FFT, foram usadas 1024 amostras, gerando uma resolução espectral de aproximadamente 0,004 Hz, valor suficiente para diferenciação de componentes presentes na faixa de baixa frequência (LF: 0,04–0,15 Hz) – faixa que reflete a modulação autonômica geral com predomínio simpático (SINGH; VINOD; SAXENA, 2004).

O Quadro 9 apresenta a configuração dos parâmetros feitas no Kubios® para análise da *short-term* HRV e da *ultra-short* HRV.

Quadro 9 – Configuração dos parâmetros no software Kubios® para análise da HRV.

Parâmetro	Configuração
Correção de Artefatos	Desativado
Frequência de corte (método <i>detrend</i>)	0,04 Hz
Banda de baixa frequência (LF)	0,04–0,15 Hz
Banda de alta frequência (HF)	0,15 Hz–0,40 Hz
FFT – Frequência de Interpolação	4 Hz
FFT – Número de Pontos no Espectro	1024 pontos
FFT – Função Janela	<i>Hamming</i>
FFT – <i>Window Width</i>	512 pontos (128 s)
FFT – <i>Window Overlap</i>	256 pontos (50%)
Dimensão da SampEn	2 batimentos \pm 0,2 DP
Flutuação de curto prazo	4–12 batimentos
Flutuação de longo prazo	13–64 batimentos

Fonte: Elaborado pelo Autor.

HRV: *heart rate variability*; FFT: *Fast Fourier Transform*; LF: *low frequency*; HF: *high frequency*. SampEn: *sample entropy*; DP: desvio padrão.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi feita nos softwares (1) SPSS® versão 27.0.1 (*Statistical Package for Social Sciences*, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), (2) MedCalc® *Diagnostic test evaluation calculator* versão 20.023 (online) (MedCalc Software Ltd, Ostende, Flandres, Bélgica) e (3) Excel 365 para estudantes (online) (*Microsoft Office 365*, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA).

As variáveis quantitativas tiveram a normalidade de distribuição examinada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. As variáveis consideradas não normais foram transformadas para a escala logarítmica (log) antes de posterior análise. A diferença dos dados foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) ou teste-H não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguida por análise *post hoc* via teste de Holm Sidak ou teste-U não-paramétrico de Mann-Whitney com correção de Bonferroni (ajuste dos valores-p para múltiplas comparações). As variáveis que apresentaram distribuição normal, porém heterogeneidade de variância, foram analisadas pela ANOVA de Welch. Para análise das variáveis categóricas (qualitativas), foi utilizado o teste de Chi-quadrado independente de Pearson ou teste Exato de Fisher (para os casos de alguma célula com $n \leq 5$) com correção de Bonferroni para múltiplas comparações.

Os principais efeitos do grupo (Controle, DMCAN⁻ e DMCAN⁺), da condição do CFT (repouso [REP], reflexo de mergulho [DR] e recuperação [REC]) e da interação (grupo × condição) foram calculados usando ANOVA mista de duas vias (*within-between*) modelo 3 × 3. Para os casos de análise de FC, com adição especial do período DR40, foi utilizado o modelo 3 × 4. Comparações de pares via análise *post hoc* de Holm Sidak foram realizadas sempre que a ANOVA revelou interação ou efeito principal significativo. Independentemente de haver interação, as comparações de pares foram feitas entre cada grupo e entre cada condição do CFT, o que foi considerado ideal para testar a hipótese do benefício da utilização do DR.

Para examinar a correlação dos parâmetros achados no CFT aos dados clínicos e demográficos dos participantes, foi utilizado o coeficiente de correlação não paramétrico de Spearman (*rho*), uma vez que alguns desses dados apresentaram distribuição não-normal e/ou heterogeneidade de variância.

Para seleção dos índices a serem usados na análise da *ultra-short* HRV no CFT, foram inicialmente verificados os níveis de correlação e de concordância (baixo viés) dos valores da *ultra-short* HRV no repouso com os da *short-term* HRV no repouso, conforme metodologia proposta por Shaffer, Meehan e Zerr (2020). A correlação foi examinada pelo coeficiente de correlação de Pearson (*r*) ou coeficiente não paramétrico de Spearman (*rho*) e apenas os índices que apresentaram correlação *ultra-short–short-term* muito forte ($r/\rho \geq 0,8$) foram selecionados para o estudo. Gráficos de Bland-Altman com limite de concordância (LOA – *limits of Agreement*) de 95% foram usados para analisar a dispersão das diferenças ($[ultra-short\ HRV] - [short-term\ HRV]$). Contudo, como a maioria das diferenças apresentou distribuição não normal, os valores foram transformados para a escala log antes de calcular as diferenças. Após transformação reversa, os valores resultantes passaram a refletir a diferença das duas medições na forma de proporção ($[ultra-short\ HRV] / [short-term\ HRV]$), permitindo interpretar o viés como variações percentuais da *short-term* – conforme feito por Wehler et al. (2021). Por fim, o teste-T pareado de Student e o teste não-paramétrico de Wilcoxon foram usados para confirmar a hipótese de igualdade dos valores.

O desempenho diagnóstico dos índices da *ultra-short* HRV de 170 s no CFT foi avaliado usando a análise de curva ROC (*receiver operating characteristic*) (HAJIAN-TILAKI, 2013) com avaliador *blinded* (cego) para o diagnóstico de CAN com base nos CARTs. A área embaixo da curva (AUC – *area under the curve*) foi calculada e comparada usando método não-paramétrico. O índice de Youden (sensibilidade + especificidade – 1) de valor mais elevado

foi escolhido como ponto de corte ideal para cada índice (para classificar mais correta e eficientemente os pacientes). A sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos positivo e negativo foram calculados.

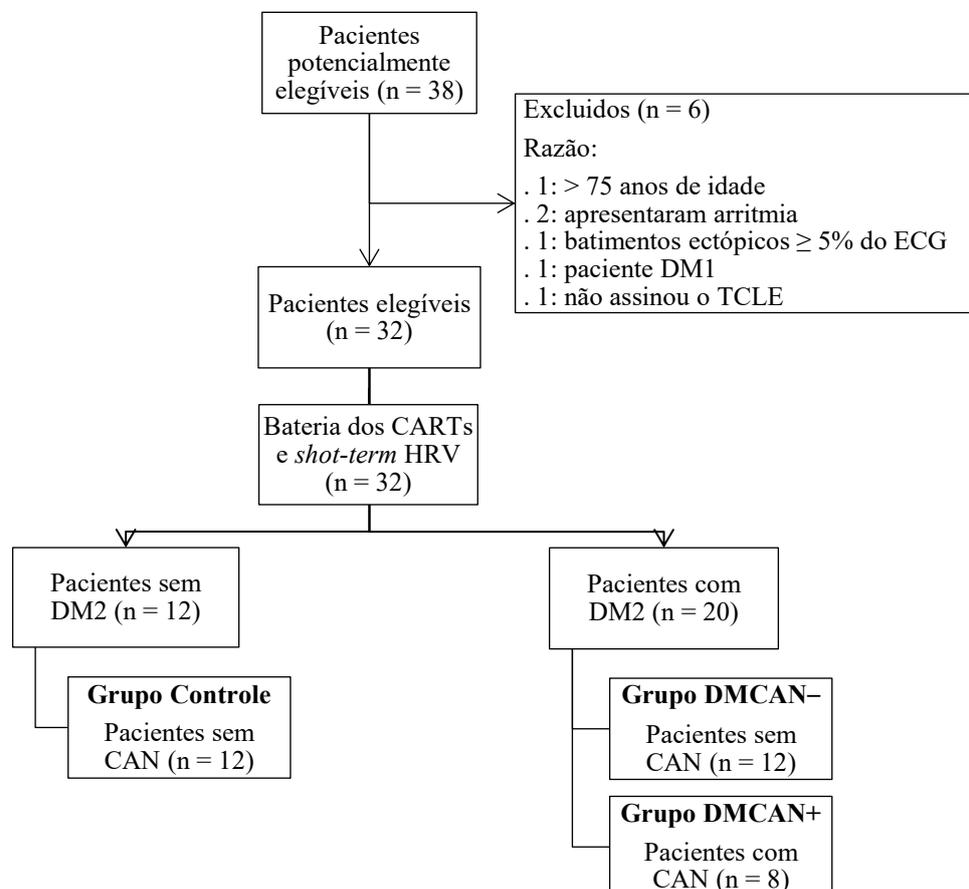
Foi realizado ainda a análise comparativa das curvas ROC a fim de comparar a robustez diagnóstica de cada índice da *ultra-short* HRV de 170 s nas condições de repouso, DR e recuperação (DELONG; DELONG; CLARKE-PEARSON, 1988). Os verdadeiros positivos e negativos, os falsos positivos e negativos e a acurácia de cada índice (em cada condição) foram calculados manualmente após dicotomizar cada variável com base nos respectivos valores de corte obtidos na análise de curva ROC.

Todas as análises consideraram intervalo de confiança (IC) de 95% e significância estatística para valores- $p < 0,05$ (métodos bicaudais). Os coeficientes de correlação de Pearson e Spearman foram considerados muito forte ($r/rho \geq 0,8$), moderado ($0,6 \leq r/rho < 0,8$), regular ($0,3 \leq r/rho < 0,6$) ou fraco ($0,1 \leq r/rho < 0,3$) (AKOGLU, 2018; CHAN, 2003). Na análise da curva ROC foi considerado que $AUC \leq 0,5$ reflete previsões aleatórias, AUC entre 0,5 e 0,6 é considerado insuficiente, AUC de 0,6 a 0,7 é considerado fraco, AUC de 0,7 a 0,8 é considerado aceitável, AUC de 0,8 a 0,9 é considerado bom, AUC de 0,9 a 1 é considerado excelente e AUC de 1,0 indica desempenho diagnóstico perfeito (MANDREKAR, 2010).

4 RESULTADOS

A Figura 26 apresenta o fluxo dos participantes e a formação dos grupos. Sessenta (60) pessoas foram consecutivamente convidadas; a taxa de desistência com ou sem aviso foi de 36,6% e a taxa de remarcação de 15,8%; assim, foram selecionados um total de 38 participantes. Entretanto, após aplicação dos critérios de exclusão, 6 tiveram a participação descontinuada. Dos 32 restantes, 20 (62,5%) apresentaram diagnóstico positivo para DM2 com base no histórico clínico do Instituto de Cardiologia de Tupã e confirmado com os exames de glicose em jejum e de HbA1c dos três últimos meses; desses, 8 (40%) foram considerados positivos para CAN (com base na pontuação composta da bateria dos CARTs e confirmado pelos índices da *short-term* HRV de 5 min no repouso) e passaram a compor o grupo DMCAN+, os demais DM2 apresentaram resultados negativos e formaram o grupo DMCAN-. Por fim, os 12 (37,5%) últimos participantes apresentaram diagnóstico negativo para DM e todos foram considerados negativos para CAN, passando a compor o grupo Controle.

Figura 26 – Fluxograma da seleção dos participantes e formação dos grupos do estudo.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

O resultado dos CARTs e o diagnóstico de CAN são apresentados na Tabela 1.

Dos 8 pacientes positivos para CAN, 3 (37,5%) apresentaram CAN subclínica ($2 \leq PC < 4$), 5 (62,5%) apresentaram sintomas estabelecidos ($PC \geq 4$) e nenhum paciente apresentou CAN grave ($PC \geq 4$ e $\Delta PAS \leq -30$ mmHg). Os valores dos índices SDNN, RMSSD, LF e HF da *short-term* HRV de 5 min no repouso também são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultado dos CARTs, índices da *short-term* HRV de 5 min no repouso e a formação dos grupos.

Variável	Controle (n = 12)	DMCAN– (n = 12)	DMCAN+ (n = 8)	valor-p
Diagnóstico de CAN (n)				
CAN subclínica	-	-	3 (37,5)	
CAN estabelecida	-	-	5 (62,5)	
CARTs				
FCb ≥ 100 bpm (n)	-	-	2 (25)	
Etapa de Repouso [Razão M:m]	1,14 \pm 0,053	1,1 \pm 0,028	1,05 \pm 0,019 *†	< 0,001
PC (n) (0/1/2/não executou)	12/0/0/0	11/1/0/0	3/3/2/0 *†	0,002
Respiração Profunda [Razão E:I]	1,19 \pm 0,087	1,18 \pm 0,11	1,06 \pm 0,038 *†	0,009
PC (n) (0/1/2/não executou)	12/0/0/0	11/1/0/0	3/3/2/0 *†	0,002
Manobra de Valsalva [Razão V:R]	1,26 (1,18-1,36)	1,31 (1,14-1,43)	1,1 (1,08-1,2) *†	0,012
PC (n) (0/1/2/não executou)	10/2/0/0	7/3/1/1	1/0/4/3 *	0,001
Mudança Ortostática [Razão 30:15]	1,23 (1,19-1,37)	1,15 (1,13-1,32)	1,02 (0,97-1,11) *†	0,001
PC (n) (0/1/2/não executou)	12/0/0/0	12/0/0/0	2/0/5/1 *†	< 0,001
Mudança Ortostática [Δ PAS] (mmHg)	7,67 \pm 9,792	4,67 \pm 7,572	-1,14 \pm 11,037	0,155
PC (n) (0/1/2/não executou)	11/1/0/0	11/1/0/0	4/3/0/1	0,080
Short-term HRV de 5min no repouso				
SDNN (ms)	21 \pm 6,81	17,1 \pm 6,76	6,8 \pm 2,49 *†	< 0,001
RMSSD (ms)	20,3 \pm 6,64	18,6 \pm 8,38	7,3 \pm 4,47 *†	0,001
LF [log] (ms ²)	2,21 \pm 0,33	1,92 \pm 0,49	1,12 \pm 0,47 *†	< 0,001
HF [log] (ms ²)	2,19 \pm 0,31	2,04 \pm 0,44	0,94 \pm 0,39 *†	< 0,001

Fonte: Elaborado pelo Autor.

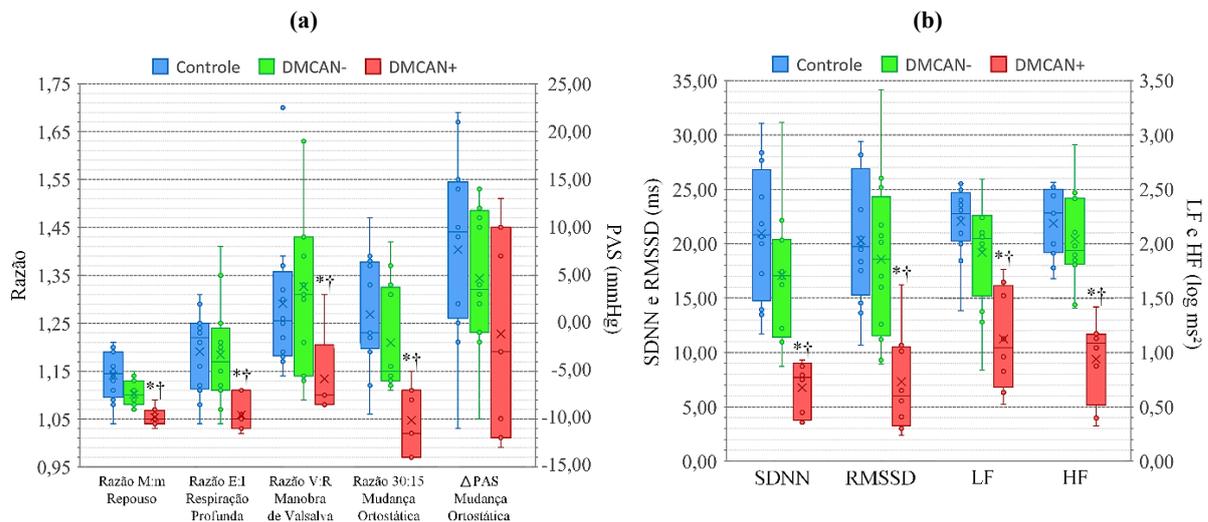
Interpretação: PC = 0 (normal), 1 (limítrofe) 2 (anormal). PC: pontuação composta dos CARTs; CAN: *cardiovascular autonomic neuropathy*; DM: diabetes mellitus; DMCAN+: grupo de pacientes DM positivos para CAN; DMCAN-: grupo de pacientes DM negativos para CAN; CARTs: *cardiovascular autonomic reflex test*; HRV: *Heart Rate Variability*; FCb: frequência cardíaca basal (= FC média no repouso); Razão M:m: razão da frequência cardíaca máxima/mínima na etapa de repouso; Razão E:I: razão da frequência cardíaca na expiração/inspiração na manobra de respiração profunda; Razão V:R: razão da frequência cardíaca Valsalva/recuperação na manobra de Valsalva; Razão 30:15: razão da frequência cardíaca no 30°/15° s na manobra mudança ortostática; Δ PAS: diferença da pressão arterial sistólica na manobra mudança ortostática; SDNN: *standard deviation of all NN intervals*; RMSSD: *square root of the mean of the sum of the squares of differences between adjacent NN intervals*; LF: *low frequency*; HF: *high frequency*; n: quantidade de pacientes; valor-p: valor de probabilidade; negrito: diferença estatística significativa ($p < 0,05$); Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão, mediana (intervalo interquartil) ou n (%) quando apropriado; LF e HF são apresentados em escala log.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle.

† $p < 0,05$ comparado ao grupo DMCAN–.

A Figura 27 apresenta a distribuição *boxplot* dos dados para melhor visualizar as diferenças dos grupos.

Figura 27 – Descritivo dos (a) resultados dos CARTs e dos (b) valores dos índices da *short-term* HRV de 5 min no repouso.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Controle: grupo de pacientes negativos para DM e para CAN; DMCAN+: grupo de pacientes DM positivos para CAN; DMCAN-: grupo de pacientes DM negativos para CAN; CARTs: *cardiovascular autonomic reflex test*; HRV: *Heart Rate Variability*; Razão M:m: razão da frequência cardíaca máxima/mínima na etapa de repouso; Razão E:I: razão da frequência cardíaca na expiração/inspiração na manobra de respiração profunda; Razão V:R: razão da frequência cardíaca Valsalva/recuperação na manobra de Valsalva; Razão 30:15: razão da frequência cardíaca no 30°/15° s na manobra mudança ortostática; ΔPAS: diferença da pressão arterial sistólica na manobra mudança ortostática; SDNN: *standard deviation of all NN intervals*; RMSSD: *square root of the mean of the sum of the squares of differences between adjacent NN intervals*; LF: *low frequency*; HF: *high frequency*; LF e HF são apresentados em escala logarítmica.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle.

† $p < 0,05$ comparado ao grupo DMCAN-.

Dentre as métricas dos CARTs, apenas a ΔPAS não mostrou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,155$). A razão da frequência cardíaca na etapa de repouso (Razão M:m) e a razão da frequência cardíaca na manobra mudança ortostática (Razão 30:15) foram os índices com maior diferença na comparação ($p \leq 0,001$), enquanto que a mudança ortostática e a Valsalva foram as manobras que apresentaram PC mais discrepantes entre os grupos ($p \leq 0,001$). A análise *post hoc* revelou que tais diferenças ocorreram entre o grupo DMCAN+ e os pacientes sem CAN (DMCAN- e Controle), porém nenhuma diferença foi observada entre os grupos DMCAN- e Controle.

Um paciente DMCAN- e três pacientes DMCAN+ não executaram a manobra de Valsalva, e um paciente DMCAN+ não executou a manobra mudança ortostática. Os índices

da *short-term* HRV de 5 min no repouso selecionados para o estudo (SDNN, RMSSD, LF e HF) permitiram analisar mais a fundo esses participantes (assim como a cada um) e corretamente alocá-los nos grupos (a Tabela 1 apresenta os valores dos índices). Assim como nos CARTs, o *post-hoc* revelou diferença significativa entre o grupo DMCAN+ e os grupos negativos para CAN e nenhuma diferença entre DMCAN- e Controle.

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS

A Tabela 2 apresenta os dados clínicos e demográficos dos participantes.

Tabela 2 – Dados clínicos e demográficos dos participantes.

Índice	Controle (n = 12)	DMCAN- (n = 12)	DMCAN+ (n = 8)	valor-p
(continua)				
Parâmetros clínicos e demográficos				
Gênero (n) (feminino/masculino)	8/4	6/6	6/2	0,652
Idade (anos)	61,2 ± 5,3	57,9 ± 12,68	60,6 ± 13,79	0,743
Cor/etnia (n) (branca/preta/parda/amarela)	10/1/1/0	6/1/4/1	3/3/2/0	0,179
Duração do DM2 (anos)	-	12 ± 6,27	13,8 ± 6,89	0,368
DM na família (n) (não, mãe, pai, ambos)	10/2/0/0	4/4/2/2 *	2/4/0/2 *	0,045
Estatura (cm)	165,5 ± 8,44	161,6 ± 8,82	166,5 ± 11,4	0,500
Massa (kg)	78,1 ± 11,7	87,4 ± 20,8	83,6 ± 19,4	0,501
IMC (kg/m ²)	28,6 ± 4,59	33,4 ± 7,05	30,1 ± 5,88	0,196
Circunferência abdominal (cm)	93,1 ± 8,14	110,5 ± 11,2 *	110 ± 11,3 *	0,001
FCb (bpm)	69,9 ± 5,27	72,6 ± 3,94	89,8 ± 13,2 *†	0,012
PAS (mmHg)	122,3 ± 11,8	128,8 ± 14,1	141,8 ± 21,2 *	0,047
PAD (mmHg)	80 ± 9,25	83,8 ± 5,35	87,8 ± 9,29	0,253
PAM (mmHg)	94,1 ± 9,87	98,9 ± 7,11	105,9 ± 10,6 *	0,041
Atividade física (MET-min/semana)	1740 (1020-1920)	590 (60-2520)	550 (60-1320)	0,101
Tabagismo (n) (não/baixo/moderado/alto)	12/0/0/0	8/2/0/2	6/0/0/2	0,100
Alcoolismo (n) (não/baixo/moderado/alto)	6/6/0/0	4/4/2/2	6/2/0/0	0,253
Histórico de Covid-19 (n)	1 (8,3)	1 (8,3)	1 (12,5)	
Perfil Glicêmico				
Glicemia de jejum (mg/dl)	93 (88-100)	157 (132-293) *	145 (128-274) *	< 0,001
HbA1c (%)	5,7 (5,1-6,1)	7,1 (6,6-10,4) *	10 (8,6-10,9) *	< 0,001
Perfil Lipídico				
Exames disponíveis (n)	9 (75)	10 (83,3)	7 (87,5)	0,865
CT (mg/dl)	175,2 ± 23,89	204,1 ± 62,12	206,3 ± 81,37	0,332
LDL-C (mg/dl)	102,4 ± 15,86	115,2 ± 54,08	113,3 ± 57,29	0,726
HDL-C (mg/dl)	56,6 ± 15,42	52,5 ± 12,37	51,8 ± 13,64	0,739
CT/HDL-C	3,3 ± 0,76	4 ± 1,34	4,2 ± 1,64	0,317
Triglicérides (mg/dl)	84 (59-125)	146 (110-182)	241 (161-291) *†	0,008

Tabela 2 – Dados clínicos e demográficos dos participantes.

Índice				(conclusão)
	Controle (n = 12)	DMCAN– (n = 12)	DMCAN+ (n = 8)	valor-p
Comorbidades e complicações do DM (n)				
Quantidade por participante	1 (0-1)	1 (0,25-1)	2,5 (1-4) *†	0,002
Histórico de hipertensão	7 (58,3)	7 (58,3)	7 (87,5)	0,366
Histórico de glaucoma	0 (0)	1 (8,3)	2 (25)	0,235
Neuropatia periférica	0 (0)	1 (8,3)	5 (62,5) *†	0,010
Retinopatia diabética	-	1 (8,3)	4 (50) †	0,035
Nefropatia diabética	-	0 (0)	2 (25)	0,068
Úlcera diabética	-	0 (0)	1 (12,5)	0,209
Medicamentos para controle do DM (n)				
Quantidade por participante	0 (0-1)	2 (1-3,75) *	2,5 (2-3,75) *	< 0,001
Metformina	4 (33,3)	11 (91,7) *	5 (62,5)	0,012
Insulina	-	3 (25)	7 (87,5) †	0,006
Sulfonilureias	-	5 (41,7)	6 (75)	0,142
Glitazonas	-	2 (16,7)	1 (12,5)	0,798
Inibidores da DPP-4	-	4 (33,3)	2 (25)	0,690
Inibidor da SGLT2	-	3 (25)	1 (12,5)	0,494
Medicamentos para controle do SCV (n)				
Quantidade por participante	2 (0-2)	2 (1-2,75)	3 (2,25-3) *	0,015
Diuréticos	1 (8,3)	3 (25)	4 (50)	0,131
Inibidores da ECA	7 (58,3)	3 (25)	2 (25)	0,224
BRA-II	0 (0)	4 (33,3)	3 (37,5)	0,055
β-bloqueadores	0 (0)	4 (33,3)	3 (37,5)	0,055
Ácido acetilsalicílico [aspirina]	1 (8,3)	1 (8,3)	4 (50)	0,060
Estatinas	7 (58,3)	7 (58,3)	6 (75)	0,806

Fonte: Elaborado pelo Autor.

Interpretação: (1) Histórico de tabagismo dos últimos 5 anos: não, baixo [$< \frac{1}{2}$ maço/semana], moderado [< 1 maço/semana] ou alto [≥ 1 maço/semana]; (2) Histórico de alcoolismo dos últimos 5 anos: não, baixo [≤ 1 vez/semana], moderado [2-3 vezes/semana] ou alto [> 3 vezes/semana]. CAN: *cardiovascular autonomic neuropathy*; DM: diabetes mellitus; DMCAN+: grupo de pacientes DM positivos para CAN; DMCAN–: grupo de pacientes DM negativos para CAN; SCV: sistema cardiovascular; IMC: índice de massa corporal; FCb: frequência cardíaca basal (= FC média no repouso); PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média; MET: *metabolic equivalent of task*; Covid-19: *coronavirus disease 2019*; HbA1c: hemoglobina glicada; CT: colesterol total; LDL-C: *low density lipoprotein cholesterol*; HDL-C: *high density lipoprotein cholesterol*; CT/HDL-C: razão de colesterol no sangue; TGO: transaminasa glutâmico oxalacética; TGP: transaminasa glutâmico pirúvica; DPP-4: dipeptidil peptidase-4; SGLT2: *sodium-glucose Co-Transporter 2*; ECA: enzima conversora da angiotensina; BRA-II: bloqueadores de receptores da angiotensina II; β: beta; n: quantidade de pacientes; valor-p: valor de probabilidade; negrito: diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Os exames de sangue são dos três últimos meses ao dia da coleta de dados. Os dados são apresentados em média \pm desvio padrão, mediana (intervalo interquartil) ou n (%) quando apropriado.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle.

† $p < 0,05$ comparado ao grupo DMCAN–.

A idade média dos pacientes foi de $60 \pm 9,6$ anos com distribuição igual nos três grupos ($p \geq 0,196$). A maioria foi do sexo feminino (62,5%) e apresentou sobrepeso ($IMC = 30,74 \pm 6,09 \text{ kg/m}^2$). O perfil lipídico, o histórico de tabagismo, de alcoolismo e o nível de atividade física semanal não mostraram diferenças entre os grupos ($p \geq 0,1$).

A análise *post hoc* revelou diferenças significativas ($p < 0,05$) nos valores de glicemia de jejum, HbA1c, circunferência abdominal, histórico familiar de DM e quantidade total de medicamentos para o controle do DM ao comparar os pacientes DM2 (DMCAN⁻ e DMCAN⁺) ao grupo Controle. Isoladamente, o grupo DMCAN⁺ apresentou parâmetros significativamente mais elevados na FCb, nos níveis de triglicérides e na quantidade total de comorbidades quando comparado aos pacientes sem CAN (DMCAN⁻ e Controle), bem como na PAS, na PAM e na quantidade total de medicamentos para controle do SCV quando comparado apenas ao grupo Controle.

Dentre as complicações diabéticas, a retinopatia ($p = 0,035$) e a neuropatia periférica ($p = 0,01$) mostraram-se significativamente mais presentes no grupo DMCAN⁺; e dentre os medicamentos para controle do DM, a insulina foi o único medicamento administrado de forma mais intensa pelo grupo DMCAN⁺ ($p = 0,006$), enquanto a Metformina é amplamente usada pelos pacientes DMCAN⁻ (91,7%).

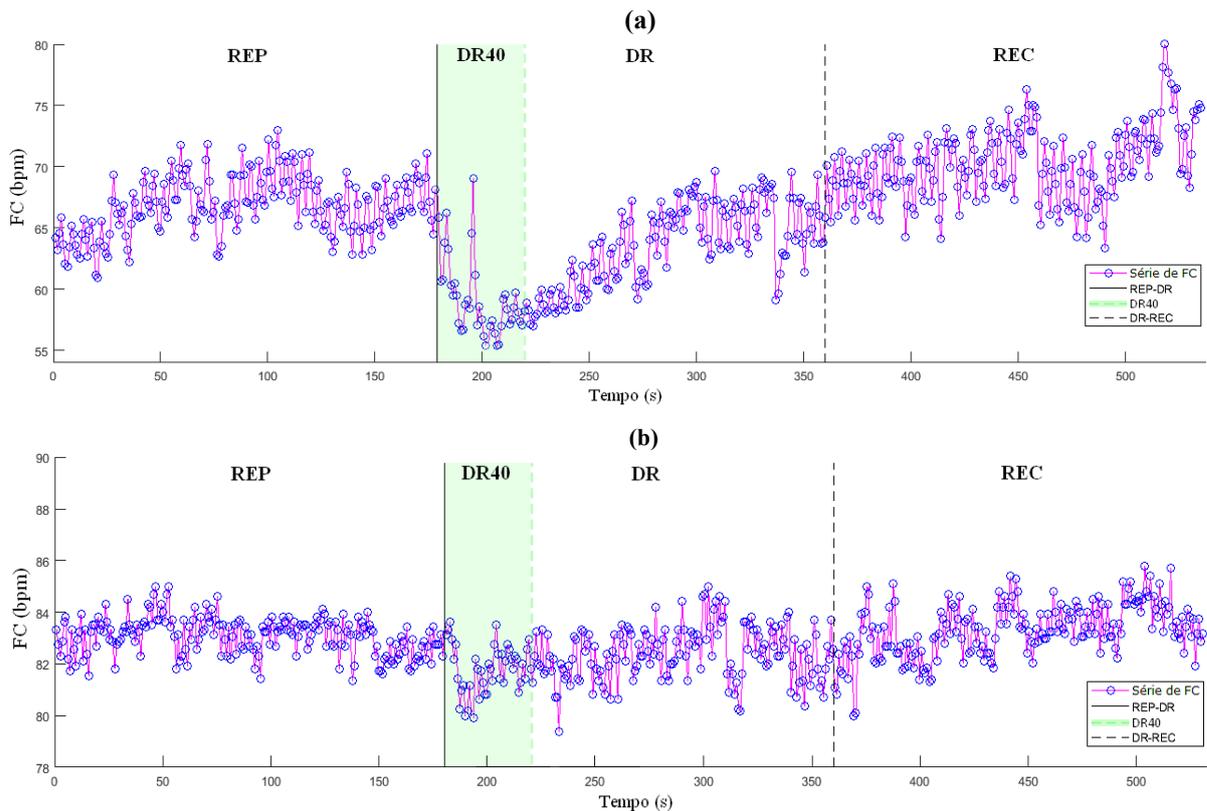
A hipertensão foi a comorbidade mais comum em todo o estudo (65,6% dos participantes) e não houve diferença estatística com relação aos tipos de medicamentos usados para controle do SCV (exceto a quantidade total de medicamentos). Nenhum participante apresentou doença infecciosa ou inflamatória crônica, hipotireoidismo ou hipertireoidismo não controlados, doença hepática crônica, neoplasia ativa, amputação de membros nem implantes elétricos. Também não foram relatados uso de medicamentos antidepressivos tricíclicos, neurolépticos, α -bloqueadores, bloqueadores de canal de Ca^{2+} , antiarrítmicos, inibidores da α -glicosidase nem agonistas do GLP-1 (*Glucagon-like peptide-1*).

4.2 AVALIAÇÃO DO CFT E DO REFLEXO DE MERGULHO (DR)

A Figura 28 apresenta as séries temporais de FC no CFT (inverso da série de intervalos NN extraída do ECG de 9 min) de dois participantes do estudo: (a) o paciente Y do grupo Controle e (b) o paciente Z do grupo DMCAN⁺ para exemplificar a evocação do DR e as diferentes respostas refletidas na FC.

O resultado das análises de FC e demais parâmetros do CFT são apresentados na Tabela 3 e na Figura 29. Dois outliers: um paciente DMCAN– e um paciente DMCAN+ (3 vezes o desvio padrão) foram removidos das análises de FC. Maiores referências sobre as métricas utilizadas vide tópico 3.6.3.4 (Métricas Investigativas de Interesse – Fase 2).

Figura 28 – Séries temporais de FC no CFT: (a) paciente Y do grupo Controle e (b) paciente Z do grupo DMCAN+.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

FC: frequência cardíaca; CFT: *cold face test*; REP: repouso; DR: *diving reflex*; DR40: período com os 40 primeiros segundos do DR; REC: recuperação; DMCAN+: grupo de pacientes DM positivos para CAN.

Ambas a FC_m e a FC_{min} mostraram efeitos principais significativos entre os grupos ($p < 0,001$) e entre as condições do CFT ($p < 0,001$), com interação significativa (grupo \times condição) apenas na FC_m ($p = 0,001$). As diferenças relativas também mostraram efeitos principais entre as condições ($p < 0,001$) e interação em Δ FC_m ($p < 0,001$).

A análise *post hoc* revelou que, em geral, os índices de FC permaneceram mais elevados no grupo DMCAN+ ($p < 0,05$) ao longo de todo o CFT e não houve diferença entre os grupos DMCAN– e Controle em nenhum momento.

Na comparação entre as condições de coleta, o *post hoc* revelou alterações significativas na FCm (e Δ FCm) dos grupos Controle e DMCAN– entre as condições REP-DR40 ($p < 0,01$); contudo, comparado ao período completo do DR (170 s), apenas o grupo Controle mostrou diferença significativa ($p < 0,01$). Já a variável FCmin (e Δ FCmin) apresentou alteração significativa tanto no DR40 quanto no DR para os dois grupos. Por fim, nenhuma alteração foi observada na FC no grupo DMCAN+ ao longo de todo o CFT.

Tabela 3 – Parâmetros do CFT: frequências cardíacas, latência da resposta, temperatura de estimulação e outros.

Índice	Controle (n = 12)	DMCAN– (n = 12)	DMCAN+ (n = 8)	Grupo	Condição	Interação
FCm (bpm)				< 0,001	< 0,001	0,001
REP	69,91 ± 4,76	70,78 ± 4,74	88,41 ± 12,31 *†			
DR40	65,46 ± 5,02 ‡‡‡	67,42 ± 4,32 ‡‡‡	86,52 ± 12,85 *†			
DR	67,63 ± 5,57 ‡‡	70,16 ± 3,71	87,27 ± 12,37 *†			
REC	70,85 ± 4,35	70,8 ± 4,24	88,04 ± 11,93 *†			
FCmin (bpm)				< 0,001	< 0,001	0,170
REP	63,02 ± 3,58	65,77 ± 5,39	85 ± 12,07 *†			
DR40	60,86 ± 4,45 ‡	62,7 ± 6,39 ‡	84,24 ± 12,89 *†			
DR	60,83 ± 4,49 ‡	62,06 ± 5,53 ‡‡	83,27 ± 12,46 *†			
REC	63,64 ± 4,14	65,52 ± 4,49	84,58 ± 11,72 *†			
Δ Pico40 (bpm)	-9,03 ± 1,98	-8,07 ± 4,35	-4,16 ± 2,57 *†	0,012		
Δ Pico40 (%)	-12,91 ± 2,69	-11,44 ± 6,21	-4,82 ± 2,92 *†	0,002		
Latência (s)	31,85 ± 18,34	31,83 ± 24,4	62,8 ± 26,77 *†	< 0,001		
Tmi (°C)	1,1 ± 0,25	1,12 ± 0,45	1,19 ± 0,38	0,867		
Tmf (°C)	10,71 ± 0,82	11,01 ± 0,98	10,73 ± 0,86	0,672		
Escala de Borg	6,63 ± 0,86	6,88 ± 1,32	5,69 ± 1,71	0,131		

Fonte: Elaborado pelo Autor.

Interpretação: Escala de Borg: avaliação da percepção de frio e dor: 0 [sem frio e dor] a 10 [frio e/ou dor máximo absolutos]. CFT: *cold face test*; CAN: *cardiovascular autonomic neuropathy*; DM: diabetes mellitus; DMCAN+: grupo de pacientes DM positivos para CAN; DMCAN–: grupo de pacientes DM negativos para CAN; REP: repouso; DR: *diving reflex*; DR40: período com os 40 primeiros segundos do DR; REC: recuperação; FCm: frequência cardíaca média; FCmin: frequência cardíaca mínima; Δ Pico40: diferença entre a FCmin no DR e a FCm no REP; Tmi: temperatura inicial da máscara; Tmf: temperatura final da máscara; valor-p: valor de probabilidade; negrito: diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Os dados são apresentados em média ± desvio padrão.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle.

† $p < 0,05$ comparado ao grupo DMCAN–.

‡ $p < 0,05$ comparado à condição REP.

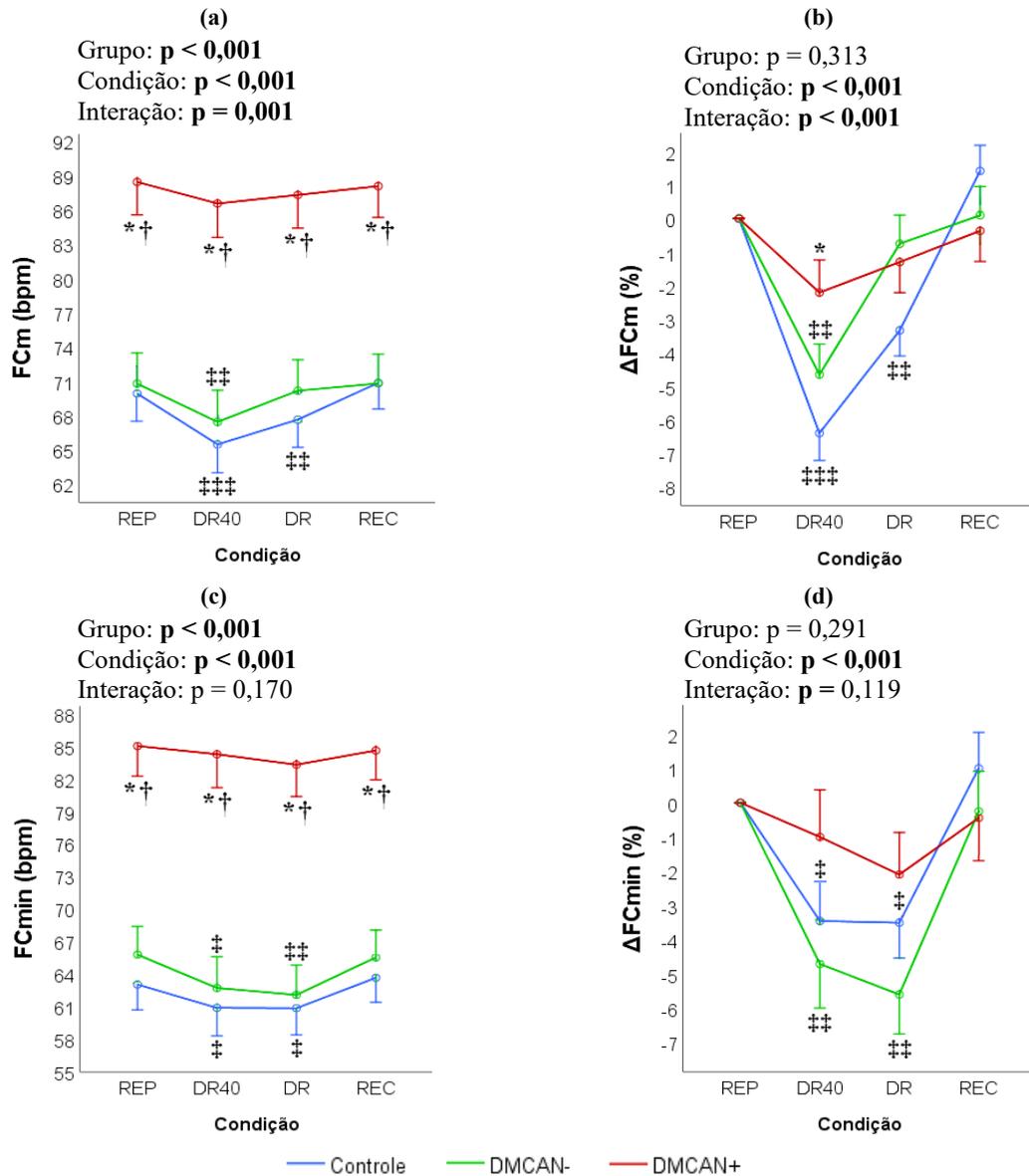
‡‡ $p < 0,01$ comparado à condição REP.

‡‡‡ $p < 0,001$ comparado à condição REP.

Na avaliação do pico de resposta, a Δ Pico40 mostrou diferenças significativas entre os grupos, tanto para valores absolutos quanto relativos ($p \leq 0,012$). Da mesma forma, a Latência para o valor mínimo alcançado no DR apresentou diferenças ($p < 0,001$). Assim como

anteriormente, o *post hoc* revelou que tais diferenças aconteceram entre o grupo DMCAN+ e os pacientes negativos para CAN, mas não entre os grupos DMCAN- e Controle.

Figura 29 – O efeito do DR na FC: métricas (a) FCm, (b) Δ FCm, (c) FCmin e (d) Δ FCmin ao longo do CFT.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

CFT: *cold face test*; CAN: *cardiovascular autonomic neuropathy*; DM: diabetes mellitus; DMCAN+: grupo de pacientes DM positivos para CAN; DMCAN-: grupo de pacientes DM negativos para CAN; REP: repouso; DR: *diving reflex*; DR40: período com os 40 primeiros segundos do DR; REC: recuperação; FCm: frequência cardíaca média; FCmin: frequência cardíaca mínima; valor-p: valor de probabilidade; os dados são apresentados em média \pm erro padrão.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle.

† $p < 0,05$ comparado ao grupo DMCAN-.

‡ $p < 0,05$ comparado à condição REP.

†† $p < 0,01$ comparado à condição REP.

††† $p < 0,001$ comparado à condição REP.

Por fim, não houve diferença entre os três grupos quanto a temperatura inicial da máscara ($T_{mi}: 1,12 \pm 0,35 \text{ }^\circ\text{C}$; $p = 0,867$) nem quanto a temperatura final ($T_{mf}: 10,86 \pm 0,9 \text{ }^\circ\text{C}$; $p = 0,672$), bem como na avaliação de sensação de frio e dor pela Escala de Borg ($6,4 \pm 1,35$; $p = 0,131$).

4.2.1 Correlação com os Dados Clínicos e Demográficos

A Tabela 4 apresenta os coeficientes de correlação de Spearman (ρ) para examinar a relação dos parâmetros do CFT com os dados clínicos e demográficos dos participantes.

Tabela 4 – Correlação dos parâmetros do CFT com os dados clínicos e demográficos dos participantes.

Índice	FCm				FCmin DR40	Δ pico40 (%)	Latência
	REP	DR40	DR	REC			
Idade	-0,19	-0,04	-0,09	-0,16	0,08	0,38*	0,36*
Duração do DM2	-0,24	-0,21	-0,24	-0,20	-0,21	0,02	-0,09
IMC	0,14	0,12	0,16	0,09	-0,03	-0,25	-0,33
Circunferência abdominal	0,28	0,32	0,32	0,19	0,23	0,07	-0,23
PAM	0,18	0,29	0,26	0,15	0,34	0,45*	0,10
Atividade física	-0,13	-0,34	-0,22	-0,12	-0,19	-0,20	0,19
Histórico de Tabagismo	0,02	0,10	0,09	0,03	0,09	0,19	0,17
Histórico de Alcoolismo	-0,20	-0,16	-0,15	-0,28	-0,19	-0,15	0,00
Glicemia de jejum	0,47**	0,55**	0,55**	0,38*	0,52**	0,41*	0,07
HbA1c	0,61**	0,7***	0,71***	0,55**	0,69***	0,57**	0,18
Triglicérides	0,73***	0,71***	0,75***	0,65***	0,59**	0,29	-0,04
CT/HDL-C	0,32	0,23	0,23	0,20	0,15	-0,13	-0,32
Comorbidades e complicações no DM	0,46*	0,52**	0,55**	0,45*	0,48**	0,34	0,10
Medicamentos para DM	0,39*	0,51**	0,50**	0,36*	0,53**	0,51**	0,22
Medicamentos para SCV	0,23	0,31	0,32	0,22	0,27	0,27	-0,07

Fonte: Elaborado pelo Autor.

FC: frequência cardíaca; CFT: *cold face test*; REP: repouso; DR: *diving reflex*; REC: recuperação; FCmin: frequência cardíaca mínima; Δ Pico40: diferença entre a FCmin no DR e a FCm no REP; DM: Diabetes Mellitus; IMC: índice de massa corporal; PAM: pressão arterial média; HbA1c: hemoglobina glicada; CT/HDL-C: razão de colesterol no sangue; SCV: sistema cardiovascular.

* $p < 0,05$;

** $p < 0,01$.

*** $p < 0,001$.

Correlações positivas foram encontradas entre a maioria dos dados e parâmetros do CFT. Em geral, a maioria das correlações da variável FCm aumentaram com o estímulo do DR. Triglicérides ($\rho \geq 0,59$, $p < 0,01$) e HbA1c ($\rho \geq 0,55$, $p < 0,01$) foram os dados de maior correlação com a FCm e a FCmin; enquanto HbA1c ($\rho \geq 0,57$, $p < 0,05$) e quantidade de medicamentos para DM ($\rho \geq 0,51$, $p < 0,05$) foram de maior correlação com Δ pico40.

4.3 ULTRA-SHORT HRV NO CFT

4.3.1 Avaliação da Confiabilidade e Seleção dos Índices

A Tabela 5 apresenta a comparação dos valores dos índices da *ultra-short* HRV de 170 s no repouso com os da *short-term* HRV de 5 min no repouso para avaliação da confiabilidade dos índices conforme metodologia proposta por Shaffer, Meehan e Zerr (2020).

Tabela 5 – Avaliação da confiabilidade dos índices de *ultra-short* HRV no repouso.

Índice	(1) Coeficiente de correlação	(2) LOA de Bland-Altman	
		Viés mediano (95% LOA)	valor-p
NNm	0,963***	1,01 (0,91-1,12)	0,266
SDNN	0,868***	1,05 (0,68-1,8)	0,481
RMSSD	0,801***	1,05 (0,6-1,96)	0,631
pNN50 †	0,736***	-	-
TRI idx	0,83***	1,02 (0,69-1,87)	0,494
TINN	0,842***	0,96 (0,59-1,63)	0,355
LF	0,914***	1,05 (0,3-3,47)	0,657
LFn	0,758***	1,01 (0,48-2,56)	0,343
HF	0,902***	1,04 (0,38-3,89)	0,316
HFn	0,758***	1 (0,43-1,94)	0,332
LF/HF	0,775***	1,02 (0,31-3,77)	0,618
SD1	0,816***	1,05 (0,76-1,97)	0,435
SD2	0,873***	1,09 (0,63-1,72)	0,546
SD1/SD2 †	0,821***	0,98 (0,75-1,43)	0,575
DFA $\alpha 1$	0,819***	1,05 (0,66-1,41)	0,987
DFA $\alpha 2$ †	0,528**	1,03 (0,36-2,33)	0,369
SampEn	0,408*	0,98 (0,74-1,3)	0,819

Fonte: Elaborado pelo Autor.

Interpretação: (1) Correlação de Pearson [r] ou de Spearman† [ρ]: muito forte [$r/\rho \geq 0,8$], moderado [$0,6 \leq r/\rho < 0,8$], regular [$0,3 \leq r/\rho < 0,6$], fraco [$0,1 \leq r/\rho < 0,3$]; (2) Viés mediano do gráfico de Bland-Altman com diferenças expressas como proporções dos valores medidos [(*ultra-short HRV* / *short-term HRV*)] e teste-T pareado de Student ou teste de Wilcoxon† para confirmação da igualdade. NNm: intervalo NN médio; SDNN: *standard deviation of all NN intervals*; RMSSD: *square root of the mean of the sum of the squares of differences between adjacent NN intervals*; pNN50: *percentage of successive intervals that differ by more than 50 ms*; TRI idx: *HRV triangular index*; TINN: *triangular interpolation of successive NN intervals*; LF: *low frequency*; LFn: *normalized low frequency*; HF: *high frequency*; HFn: *normalized high frequency*; SD: *Poincaré plot standard deviation*; SampEn: *sample entropy*; DFA: *detrended fluctuation analysis*; 95% LOA: limites de concordância de 95%; negrito: correlação muito forte; valor-p: valor de probabilidade;

† índice com distribuição não normal, analisado com a correlação de Spearman e o teste pareado de Wilcoxon.

* $p < 0,05$.

** $p < 0,01$.

*** $p < 0,001$.

Onze dos 17 índices (64,7%) de HRV apresentaram correlação muito forte ($r/\rho \geq 0,8$) e foram selecionados para o estudo: NNm, SDNN, RMSSD, TRI idx, TINN, LF, HF, SD1,

SD2, SD1/SD2 e DFA $\alpha 1$; com destaque para NNm, LF e HF ($r \geq 0,9$). Com o intuito de avaliar o balanço simpático-parassimpático no CFT, adicionalmente foi incluído o índice LF/HF ($r = 0,775$). Os 5 demais índices apresentaram $r/\rho < 0,8$ e foram desconsiderados deste estudo.

Dos 12 índices selecionados, 11 apresentaram viés mediano $\leq |\pm 5\%|$ na LOA de 95% de Bland-Altman, apenas SD2 apresentou viés mediano = 9%. Vale registrar que o viés do índice pNN50% não foi computado pois 21 dos 34 participantes (61,7%) apresentaram ao menos um dos valores de pNN50% igual a zero (o que impossibilitou o uso da transformada log). Por fim, nenhum índice apresentou diferença de valor nos testes pareados ($p \geq 0,266$).

4.3.2 Análise Discriminante via ANOVA Mista

A Tabela 6 apresenta os valores dos 12 índices da *ultra-short* HRV de 170 s no CFT e a **Erro! Fonte de referência não encontrada.** ilustra graficamente a alteração dos valores ao longo do teste. Dois outliers: um paciente DMCAN⁻ e um paciente DMCAN⁺ (3 vezes o desvio padrão) foram removidos das análises de NNm. Vale comentar que condição DR40 não foi utilizada na análise de HRV pois a mesma envolveu janelas de 170 s.

Onze dos 12 índices selecionados (91,7%) mostraram-se significativamente mais enfraquecidos nos pacientes DMCAN⁺ ($p \leq 0,036$) em ao menos uma das três condições do CFT (REP, DR, REC); apenas LF/HF não se mostrou diferente entre os grupos ($p = 0,141$). Na comparação entre as condições, foram observados efeitos principais significativos nos valores de RMSSD, LF/HF, SD1 e DFA $\alpha 1$ ($p \leq 0,023$), e ocorreu interação significativa apenas em NNm ($p = 0,006$) e em HF ($p = 0,045$).

A análise *post hoc* revelou que, além do LF/HF, os índices SD1/SD2 e DFA $\alpha 1$ não indicaram diferença significativa entre os grupos durante o REP; diferenças ($p < 0,05$), entretanto, surgiram entre o DMCAN⁺ e os outros grupos durante as condições DR e a REC. Ao comparar apenas os pacientes sem CAN (DMCAN⁻ e Controle), o *post hoc* revelou ainda diferenças significativas nos índices SDNN, TRI idx, TINN e SD2 durante o REP e a REC; contudo, durante o DR (estímulo), nenhuma diferença foi observada entre eles.

Comparando as condições de coleta, o *post hoc* revelou que ocorreram mudanças significativas nos valores de NNm, RMSSD, HF e SD1 entre as condições REP-DR, e nos valores de NNm, HF e DFA $\alpha 1$ entre as condições DR-REC. Tais mudanças ocorreram em ao menos um dos grupos negativos para CAN. Já o grupo DMCAN⁺ apresentou alteração apenas

nos índices HF e LF/HF, que ocorreu entre as condições DR-REC. Por fim, nenhuma mudança significativa foi observada ao comparar as condições REP-REC.

Tabela 6 – Índices de *ultra-short* HRV de 170 s no CFT: os grupos Controle, DMCAN– e DMCAN+ nas condições de repouso, sob efeito do DR e durante a recuperação, os efeitos principais e o efeito da interação.

(continua)

Índice	Controle (n = 12)	DMCAN– (n = 12)	DMCAN+ (n = 8)	Grupo	Condição	Interação
NNm (ms)				< 0,001	< 0,001	0,006
REP	862,05 ± 61,39	851,19 ± 58,43	691,09 ± 77,19 *†			
DR	892,85 ± 76,48 ‡	857,4 ± 46,68	700,3 ± 79,81 *†			
REC	849,96 ± 55,06 §	850,23 ± 52,2	693,37 ± 74,88 *†			
SDNN (ms)				< 0,001	0,065	0,416
REP	22,15 ± 3,54	16,68 ± 4,39 *	6,96 ± 2,82 *†			
DR	23,59 ± 5,83	20,03 ± 7,18	7,61 ± 2,76 *†			
REC	24,11 ± 4,51	17,87 ± 3,61 *	7,51 ± 2,48 *†			
RMSSD (ms)				< 0,001	0,023	0,588
REP	22,48 ± 4,18	18,3 ± 7,52	6,27 ± 2,87 *†			
DR	23,98 ± 3,89	21,84 ± 8,25 ‡	7,16 ± 3,61 *†			
REC	23,38 ± 5,36	19,74 ± 6,41	6,36 ± 3,21 *†			
TRI idx				< 0,001	0,087	0,869
REP	6,09 ± 1,06	4,93 ± 0,87 *	2,5 ± 0,87 *†			
DR	6,59 ± 1,6	5,45 ± 1,61	2,72 ± 0,93 *†			
REC	6,51 ± 1,27	5,2 ± 0,61 *	2,46 ± 0,73 *†			
TINN (ms)				< 0,001	0,097	0,332
REP	106,8 ± 17,37	79,4 ± 23,12 *	33,75 ± 13,4 *†			
DR	117,8 ± 42,81	101,9 ± 47,5	36,5 ± 13,68 *†			
REC	117,3 ± 24,14	85,4 ± 16,41 *	38,25 ± 14,97 *†			
LF (ms ²) [log]				< 0,001	0,614	0,834
REP	2,2 ± 0,24	1,97 ± 0,43	1,12 ± 0,58 *†			
DR	2,16 ± 0,38	2,07 ± 0,35	1,2 ± 0,44 *†			
REC	2,23 ± 0,26	2,02 ± 0,32	1,2 ± 0,56 *†			
HF (ms ²) [log]				< 0,001	< 0,001	0,045
REP	2,35 ± 0,28	2,01 ± 0,2 *	0,96 ± 0,4 *†			
DR	2,42 ± 0,22 ‡	2,21 ± 0,33 ‡	1,1 ± 0,47 *†			
REC	2,37 ± 0,26	2,04 ± 0,24 §	0,93 ± 0,39 *†			
LF/HF [log]				0,141	0,012	0,592
REP	-0,15 ± 0,32	-0,04 ± 0,45	0,16 ± 0,62			
DR	-0,25 ± 0,25	-0,14 ± 0,41	0,1 ± 0,48			
REC	-0,13 ± 0,31	-0,02 ± 0,37	0,27 ± 0,59 §			
SD1 (ms)				< 0,001	0,023	0,538
REP	15,94 ± 2,96	12,98 ± 5,33	4,26 ± 2,13 *†			
DR	17 ± 2,76	15,48 ± 5,85 ‡	4,67 ± 2,47 *†			
REC	16,58 ± 3,8	14 ± 4,54	4,1 ± 2,12 *†			
SD2 (ms)				< 0,001	0,100	0,438
REP	26,86 ± 4,71	19,44 ± 4,57 *	8,39 ± 3,9 *†			
DR	28,54 ± 8,31	23,34 ± 8,28	9,17 ± 4,34 *†			
REC	28,96 ± 5,53	20,77 ± 3,8 *	9,67 ± 3,31 *†			

Tabela 6 – Índices de ultra-short HRV de 170 s no CFT: os grupos Controle, DMCAN– e DMCAN+ nas condições de repouso, sob efeito do DR e durante a recuperação, os efeitos principais e o efeito da interação.

(conclusão)

Índice	Controle (n = 12)	DMCAN– (n = 12)	DMCAN+ (n = 8)	Grupo	Condição	Interação
SD1/SD2				0,030	0,073	0,295
REP	0,6 ± 0,12	0,66 ± 0,21	0,53 ± 0,2			
DR	0,62 ± 0,13	0,67 ± 0,14	0,49 ± 0,14 †			
REC	0,57 ± 0,11	0,67 ± 0,19	0,41 ± 0,12 †			
DFA $\alpha 1$				0,008	0,012	0,140
REP	0,88 ± 0,22	0,94 ± 0,28	1,13 ± 0,27			
DR	0,82 ± 0,16	0,85 ± 0,23	1,19 ± 0,27 *†			
REC	0,96 ± 0,19 §	0,9 ± 0,28	1,32 ± 0,23 *†			

Fonte: Elaborado pelo Autor.

CFT: *cold face test*; CAN: *cardiovascular autonomic neuropathy*; DM: diabetes mellitus; DMCAN+: grupo de pacientes DM positivos para CAN; DMCAN–: grupo de pacientes DM negativos para CAN; REP: repouso; DR: *diving reflex*; REC: recuperação; NNm: intervalo NN médio; SDNN: *standard deviation of all NN intervals*; RMSSD: *square root of the mean of the sum of the squares of differences between adjacent NN intervals*; TRI idx: HRV *triangular index*; TINN: *triangular interpolation of successive NN intervals*; LF: *low frequency*; HF: *high frequency*; SD: *Poincaré plot standard deviation*; DFA: *detrended fluctuation analysis*; valor-p: valor de probabilidade; negrito: diferença estatística significativa ($p < 0,05$); os dados são apresentados em média ± desvio padrão; LF, HF e LF/HF são apresentados em escala logarítmica.

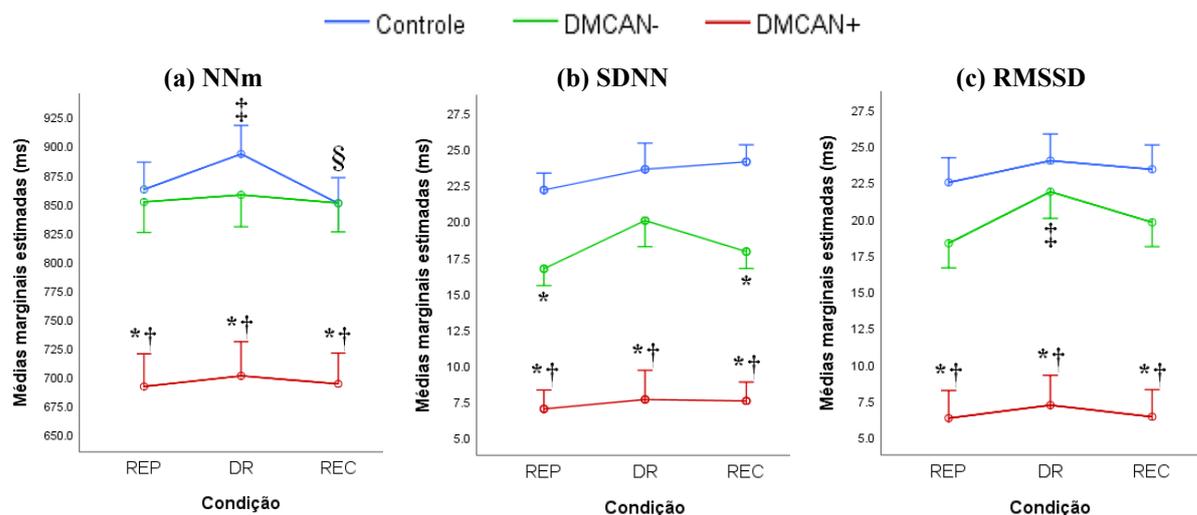
* $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle.

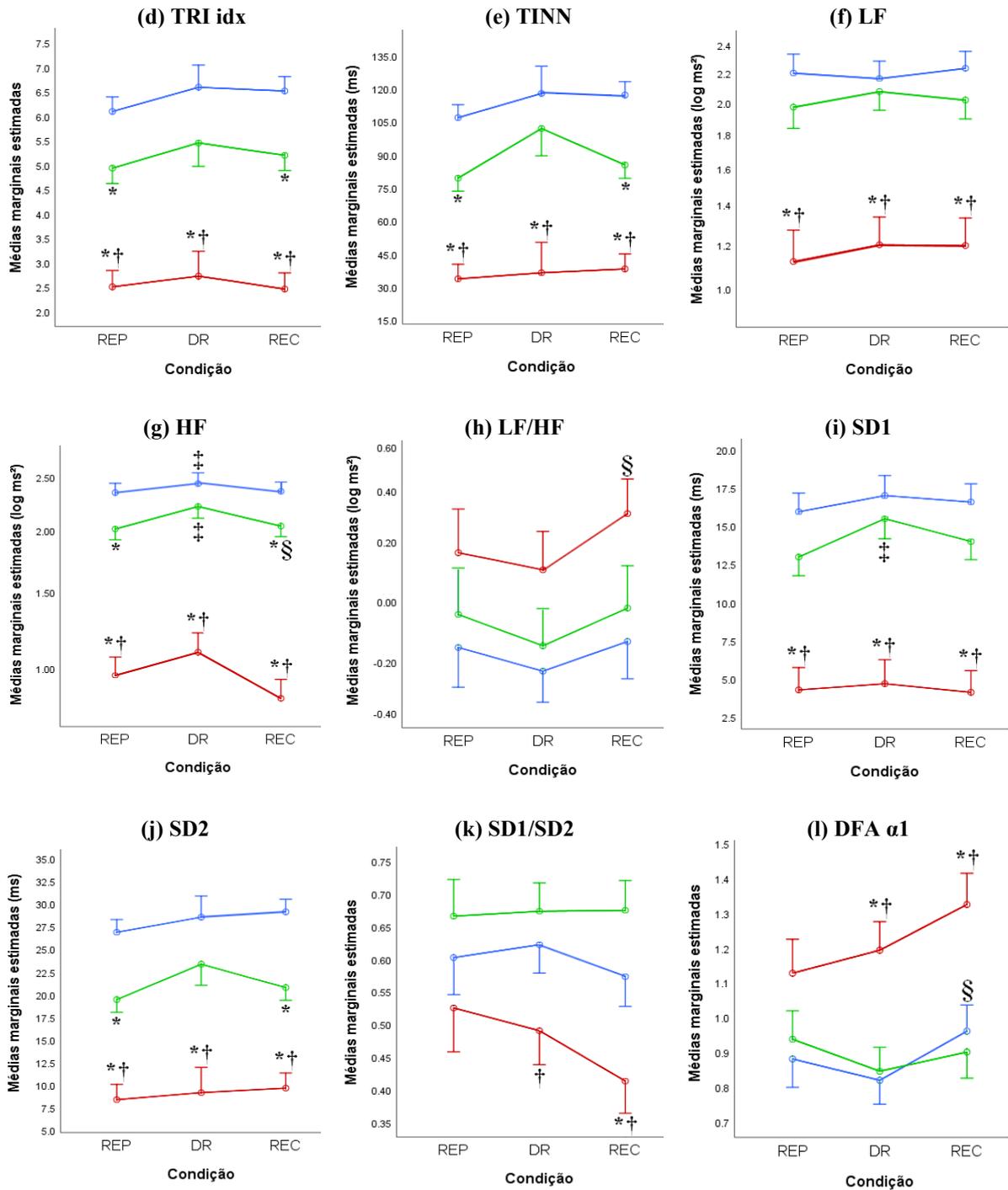
† $p < 0,05$ comparado ao grupo DMCAN–.

‡ $p < 0,05$ comparado à condição REP.

§ $p < 0,05$ comparado à condição DR.

Figura 30 – Índices de *ultra-short* HRV de 170 s no CFT: alteração dos valores dos índices ao longo do CFT.





Fonte: Elaborado pelo Autor.

Os dados são apresentados em média ± erro padrão. (f), (g) e (h) estão em escala logarítmica.

- * p < 0,05 comparado ao grupo Controle
- † p < 0,05 comparado ao grupo DMCAN-
- ‡ p < 0,05 comparado à condição REP
- § p < 0,05 comparado à condição DR

4.3.3 Desempenho Diagnóstico

A Tabela 7 apresenta os resultados das análises das curvas ROC para os índices selecionados da *ultra-short* HRV de 170 s em cada condição do CFT (repouso [REP], reflexo de mergulho [DR] e recuperação [REC]) e informações detalhadas sobre as estatísticas de diagnóstico de CAN. Detalhes da análise individual e comparativa das curvas ROC, bem como a apresentação das próprias curvas, são apresentados no APÊNDICE C.

A análise individual das curvas ROC indicou AUC variando de 0,58 a 1 para os índices no REP, enquanto os mesmos parâmetros apresentaram AUC variando de 0,67 a 1 no DR (quase todos mais elevados na comparação com seus pares do REP [exceto RMSSD e TRI idx]) e AUC variando de 0,73 a 1 na REC (todos mais elevados na comparação com seus pares do REP). SDNN e TINN foram os índices no domínio do tempo capazes de diagnosticar CAN com a maior acurácia diagnóstica (AC; REP vs DR vs REC; SDNN = 93,8% vs 100% vs 100%; TINN = 93,8% vs 100% vs 100%); HF foi o índice no domínio da frequência capaz de diagnosticar CAN com 100% de acurácia nas três condições do CFT; e SD2 o índice não-linear com a maior acurácia diagnóstica (AC, REP vs DR vs REC, SD2 = 90,6% vs 100% vs 96,9%). Informações sobre outras estatísticas de diagnóstico são apresentadas na Tabela 7.

A análise comparativa das curvas ROC revelou diferença significativa na AUC de DFA $\alpha 1$ na comparação REP-DR (AUC, REP vs DR, DFA $\alpha 1$ = 0,62 vs 0,73, $p = 0,041$) (APÊNDICE C), com acurácia diagnóstica subindo de 59,4% para 78,1% (Tabela 7); e diferença significativa na AUC de SD1/SD2 na comparação REP-REC (AUC, REP vs REC, SD1/SD2 = 0,58-0,73, $p = 0,017$) (APÊNDICE C), com acurácia diagnóstica subindo de 75% para 81,3% (Tabela 7). O desempenho diagnóstico dos demais índices, tanto na comparação REP-DR quanto na comparação REP-REC, não foram significativamente diferentes ($p \geq 0,099$ e $p \geq 0,054$, respectivamente) (APÊNDICE C), embora a maioria desses índices demonstrou desempenho diagnóstico superior nas condições DR e/ou REC na análise da curva ROC individual (Tabela 7).

A especificidade média (E_m) dos índices em cada condição do CFT foi maior para as variáveis no DR (REP vs DR vs REC, $E_m = 89,6\%$ vs $94,1\%$ vs $93,7\%$) enquanto a sensibilidade média (S_m) foi maior na REC (REP vs DR vs REC, $S_m = 83,3\%$ vs $87,5\%$ vs $88,5\%$). Por fim, a acurácia geral (AC geral) do teste foi maior para as variáveis no DR e na REC (REP vs DR vs REC, AC geral = 88% vs $92,5\%$ vs $92,5\%$), com 4,5 pontos percentuais acima da performance diagnóstica no REP.

Tabela 7 – Desempenho diagnóstico dos índices da *ultra-short* HRV de 170 s no CFT base na curva ROC.

Índice	AUC* (95% CI)	S (%) (95% CI)	E (%) (95% CI)	VPP (%) (95% CI)	VPN (%) (95% CI)	VP (n)	FP (n)	VN (n)	FN (n)	AC (%)
Repouso [REP]										
NNm	0,8 (0,57-1)	62,5 (25-92)	100 (86-100)	100	88,9 (77-95)	5	0	24	3	90,6
SDNN	0,99 (0,97-1)	100 (63-100)	91,7 (73-99)	80 (52-94)	100	8	2	22	0	93,8
RMSSD	0,99 (0,98-1)	100 (63-100)	95,8 (79-100)	88,9 (54-98)	100	8	1	23	0	96,9
TRI idx	0,97 (0,92-1)	100 (63-100)	91,7 (73-99)	80 (52-94)	100	8	2	22	0	93,8
TINN	0,98 (0,94-1)	100 (63-100)	91,7 (73-99)	80 (52-94)	100	8	2	22	0	93,8
LF	0,9 (0,79-1)	87,5 (47-100)	83,3 (63-95)	63,6 (41-82)	95,2 (76-99)	7	4	20	1	84,4
HF	1 (1-1)	100 (47-100)	100 (63-95)	100	100	8	0	24	0	100
LF/HF	0,63 (0,35-0,9)	37,5 (9-52)	100 (86-100)	100	82,8 (74-89)	3	0	24	5	84,4
SD1	0,96 (0,88-1)	87,5 (47-100)	95,8 (79-100)	87,5 (50-98)	95,8 (79-99)	7	1	23	1	93,8
SD2	0,97 (0,93-1)	100 (63-100)	87,5 (68-97)	72,7 (48-89)	100	8	3	21	0	90,6
SD1/SD2	0,58 (0,29-0,87)	50 (16-84)	83,3 (63-95)	50 (24-76)	83,3 (71-91)	4	4	20	4	75,0
DFA α 1	0,62 (0,36-0,88)	75 (35-97)	54,2 (33-74)	35,3 (23-50)	86,7 (65-96)	6	11	13	2	59,4
Reflexo de Mergulho [DR]										
NNm	0,82 (0,6-1)	62,5 (25-92)	100 (86-100)	100	88,9 (77-95)	5	0	24	3	90,6
SDNN	1 (1-1)	100 (63-100)	100 (86-100)	100	100	8	0	24	0	100
RMSSD	0,98 (0,95-1)	100 (63-100)	95,8 (79-100)	88,9 (54-98)	100	8	1	23	0	96,9
TRI idx	0,96 (0,91-1)	100 (63-100)	91,7 (73-99)	80 (52-94)	100	8	2	22	0	93,8
TINN	1 (1-1)	100 (63-100)	100 (86-100)	100	100	8	0	24	0	100
LF	0,97 (0,92-1)	100 (63-100)	87,5 (68-97)	72,7 (48-89)	100	8	3	21	0	90,6
HF	1 (1-1)	100 (63-100)	100 (86-100)	100	100	8	0	24	0	100
LF/HF	0,7 (0,44-0,96)	62,5 (25-92)	91,7 (73-99)	71,4 (37-91)	88 (75-95)	5	2	22	3	84,4
SD1	0,96 (0,9-1)	87,5 (47-100)	95,8 (79-100)	87,5 (50-98)	95,8 (79-99)	7	1	23	1	93,8
SD2	1 (1-1)	100 (63-100)	100 (86-100)	100	100	8	0	24	0	100
SD1/SD2	0,67 (0,4-0,94)	62,5 (25-92)	87,5 (68-97)	62,5 (34-85)	88 (74-95)	5	3	21	3	81,3
DFA α 1	0,73 (0,48-0,99)	75 (35-97)	79,2 (58-93)	54,5 (33-74)	90,5 (74-97)	6	5	19	2	78,1
Recuperação [REC]										
NNm	0,8 (0,57-1)	62,5 (25-92)	100 (86-100)	100	88,9 (77-95)	5	0	24	3	90,6
SDNN	1 (1-1)	100 (63-100)	100 (86-100)	100	100	8	0	24	0	100
RMSSD	1 (1-1)	100 (63-100)	100 (86-100)	100	100	8	0	24	0	100
TRI idx	0,97 (0,92-1)	100 (63-100)	95,8 (79-100)	88,9 (54-98)	100	8	1	23	0	96,9
TINN	1 (1-1)	100 (63-100)	100 (86-100)	100	100	8	0	24	0	100
LF	0,94 (0,86-1)	100 (63-100)	83,3 (63-95)	66,7 (45-83)	100	8	4	20	0	87,5
HF	1 (1-1)	100 (63-100)	100 (86-100)	100	100	8	0	24	0	100
LF/HF	0,73 (0,47-1)	62,5 (25-92)	95,8 (79-100)	83,3 (41-97)	88,5 (76-95)	5	1	23	3	87,5
SD1	0,97 (0,92-1)	87,5 (47-100)	100 (86-100)	100	96 (79-99)	7	0	24	1	96,9
SD2	0,98 (0,95-1)	100 (63-100)	95,8 (79-100)	88,9 (54-98)	100	8	1	23	0	96,9
SD1/SD2	0,73 (0,48-0,99)	62,5 (25-92)	87,5 (68-97)	62,5 (34-85)	88 (74-95)	5	3	21	3	81,3
DFA α 1	0,76 (0,51-1)	87,5 (47-100)	66,7 (45-84)	46,7 (32-62)	94,1 (71-99)	7	8	16	1	71,9

Fonte: Elaborado pelo Autor.

AUC: *area under the curve*; S: sensibilidade; E: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; VP: verdadeiro positivo; FP: falso positivo; VN: verdadeiro negativo; FN: falso negativo; AC: acurácia; NNm: intervalo NN médio; SDNN: *standard deviation of all NN intervals*; RMSSD: *square root of the mean of the sum of the squares of differences of adjacent NN intervals*; TRI idx: *HRV triangular index*; TINN: *triangular interpolation of successive NN intervals*; LF: *low frequency*; HF: *high frequency*; SD: *Poincaré plot standard deviation*; DFA: *detrended fluctuation analysis*; n: quantidade de pacientes; IC: intervalo de confiança; Os dados são apresentados em quantidade ou em porcentagem (%) quando apropriado.

5 DISCUSSÃO

Devido a pandemia do SARS-CoV-2, houve significativa resistência no recrutamento dos participantes. Preocupações e incertezas com a COVID-19 levaram ainda a uma taxa de desistência (com ou sem aviso prévio) de 36,6% dos indivíduos que haviam aceitado participar.

Este estudo envolveu no total 20 pacientes DM2 e 12 controles não diabéticos. Em geral, cada atendimento levou cerca de 2 h com intervalo de 30 min para desinfecção e preparação da sala. A bateria dos CARTs, a análise da *short-term* HRV de 5 min no repouso, a análise das séries temporais de FC no CFT e as análises das três janelas de *ultra-short* HRV de 170 s no CFT foram realizadas simultaneamente em cada um desses indivíduos para avaliar as funções autonômicas cardiovasculares.

5.1 PREVALÊNCIA DE CAN NOS PARTICIPANTES

Nossos dados (Tabela 1) revelaram taxa de prevalência de CAN de 40% ($n = 8$) nos pacientes DM2. De acordo com uma revisão ainda recente (FISHER; TAHRANI, 2017), a prevalência de CAN tem variado de 31% a 73% no DM2. Tal variação é parcialmente explicada pelo uso de diferentes critérios de seleção das amostras, diferentes métodos de avaliação e diferentes critérios de diagnóstico de CAN. Neste trabalho, foram incluídos apenas pacientes DM2 com idade entre 40–75 anos; a média de idade resultante foi de $58,9 \pm 11,5$ anos, a duração do DM = $12,5 \pm 6,39$ anos e a concentração de HbA1c = $8,1 [7,1-10,5]$ % (Tabela 2).

Em um estudo anterior, Banthia et al. (2013) avaliaram 18 indivíduos DM2 usando critério de avaliação e diagnóstico semelhante ao nosso ($PC \geq 2$) e reportaram prevalência de CAN em 44,4%, equivalente a taxa que encontramos. Contudo, as características das amostras foram razoavelmente diferentes. Em um outro estudo, Mendivil et al. (2016) avaliaram 154 indivíduos DM2 com características semelhantes a nossa (idade, duração do DM e HbA1c) e, usando critério de avaliação e diagnóstico também semelhantes, reportaram prevalência de CAN em 68%. Comparada a Mendivil et al., creditamos que a taxa de prevalência inferior reportada em nosso estudo é parcialmente resultado de viés causado pela situação da COVID-19: muitos pacientes com histórico suspeito de CAN não aceitaram ou desistiram de participar da pesquisa com receio da pandemia devido suas complicações em saúde. Acreditamos que a presença desses pacientes aumentaria a taxa de prevalência de CAN em nosso estudo.

Vale destacar que, dentre as cinco métricas dos CARTs, apenas a Δ PAS não mostrou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,155$). Esse achado pode ser parcialmente explicado pelo o que se acredita ser a progressão natural da CAN, que sugere que a disfunção simpática tende a estar mais envolvida nas fases avançadas da CAN (JELINEK et al., 2017; POP-BUSUI et al., 2017a; SPALLONE et al., 2011a). No presente estudo, 37,5% dos pacientes DMCAN+ foram diagnosticados em estágio inicial de CAN (*i.e.*, CAN subclínica), por isto, a maioria possivelmente tem apenas sintomas parassimpáticos.

Neste trabalho todos os participantes negativos para DM2 (Controle) ($n = 12$) foram também considerados negativos para CAN ($PC \leq 1$); contudo, vale ressaltar que a CAN não é exclusividade do DM. Como a hiperglicemia é considerada a principal entre as etiologias da doença, a CAN, assim como outros tipos de neuropatias, é mais comum em pacientes com DM. Um trabalho recente (WEHLER et al., 2021) reportou prevalência de CAN em 7,5% dos indivíduos negativos para DM e em 30% dos pacientes positivos para DM (DM1 ou DM2); outro estudo (LIN et al., 2017) reportou 5% e 44,4%, respectivamente.

5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS

Os pacientes DM2 (DMCAN- e DMCAN+) apresentaram valores de glicemia de jejum, HbA1c, circunferência abdominal, histórico familiar de DM e quantidade total de medicamentos para o controle do DM superiores aos pacientes Controle ($p < 0,05$) (Tabela 2). Tais parâmetros vão de encontro com as estatísticas nacionais e internacionais devido ao perfil hiperglicêmico dos indivíduos diabéticos e do histórico familiar de DM (ADA, 2020; IDF, 2019; SBD, 2020; WHO, 2019). Dentre os medicamentos para controle do DM, a insulina é administrada em maior proporção pelo grupo DMCAN+ (DMCAN- vs DMCAN+, 25% vs 87,5%, $p = 0,006$), refletindo a relação da prevalência de CAN com a evolução do quadro diabético; enquanto a Metformina é mais usada pelos pacientes DMCAN- (91,7%) e administrada por 4 pacientes Controle para regulação de seus níveis pré-diabéticos (Tabela 2).

Dentre as comorbidades e complicações do DM, o grupo DMCAN+ apresentou maior prevalência de neuropatia periférica (DMCAN- vs DMCAN+, 8,3% vs 62,5%, $p = 0,01$) e de retinopatia diabética (DMCAN- vs DMCAN+, 8,3% vs 50%, $p = 0,035$) (Tabela 2). De acordo com a literatura, os principais preditores de CAN incluem descontrole glicêmico, duração do DM, hipertensão, presença de polineuropatia diabética, retinopatia diabética, nefropatia diabética e insuficiência renal (AGASHE; PETAK, 2018; BALCIOĞLU; MÜDERRISOĞLU,

2015; BISSINGER, 2017; DYCK et al., 1993; FISHER; TAHRANI, 2017; PATEL; HORAK; TIRYAKI, 2020; POP-BUSUI et al., 2017a, 2017b; SPALLONE et al., 2011b; TESFAYE et al., 2010; VALENSI et al., 2003; VINIK et al., 2018; VINIK; ERBAS; CASELLINI, 2013; VINIK; ZIEGLER, 2007; WITTE et al., 2005; YUN et al., 2018). Em nosso estudo, embora maiores no grupo DMCAN+, não foram observadas diferenças significativas no controle glicêmico (DMCAN- vs DMCAN+, HbA1c = 7,1% [6,6-10,4] vs 10% [8,6-10,9], p = 0,63), na duração do DM (DMCAN- vs DMCAN+, 12 ± 6,27 anos vs 13,8 ± 6,89 anos, p = 0,368) na PAM (DMCAN- vs DMCAN+, PAM = 98,9 ± 7,11 mmHg vs 105,9 ± 10,58 mmHg, p = 0,324) nem na prevalência de nefropatia diabética (DMCAN vs DMCAN+, 0% vs 25%, p = 0,068) (Tabela 2). Acreditamos que tais diferenças não puderam ser evidenciadas devido ao número amostral baixo dos grupos.

Em termos cardiovasculares, os pacientes DMCAN+ apresentaram parâmetros de risco cardiovascular mais elevados (p < 0,05) refletidos na FCb e nos níveis de triglicérides quando comparados aos pacientes sem CAN (DMCAN- e Controle) (Tabela 2). Quando comparado apenas ao grupo Controle, o grupo DMCAN+ apresentou ainda preditores significativos refletidos na PAS, na PAM (hipertensão) e na quantidade total de medicamentos para controle do SCV (Tabela 2). Acreditamos que não foi possível observar maiores diferenças entre os pacientes DMCAN+ e DMCAN- devido ao número amostral relativamente baixo em nosso trabalho. Outros parâmetros de risco cardiovascular reportados na literatura incluem: IMC, nível de atividade física, alcoolismo, tabagismo, CT e CT/HDL-C; porém, nenhum deles mostrou diferença entre os grupos (p ≥ 0,05) (Tabela 2). Os pacientes DM2 apresentaram CT (205 ± 68,22 mg/dl [desejável < 200]) e CT/HDL-C (4,1 ± 1,42 [desejável < 3,5]) alterados, porém os valores isolados de LDL-C e de HDL-C dos três grupos estavam dentro dos níveis desejados, consistente com o uso prevalente de medicamentos hipoglicemiantes (estatinas) (62,5% dos indivíduos) (Tabela 2).

5.3 AVALIAÇÃO DO CFT E DO REFLEXO DE MERGULHO (DR)

Sobre o CFT desenvolvido (POP DR-CFT, ANEXO E): (1) o uso da máscara facial em gel permitiu estimular os termorreceptores das regiões V1, V2 e V3 do nervo trigêmeo (Figura 14) de forma uniforme e bilateralmente, o que, segundo Heath e Downey (1990), resulta em variações cardiovasculares mais significativas; (2) a temperatura inicial da máscara (Tmi) (averiguada na região paranasal – principal ponto de gatilho) foi de 1,12 ± 0,35 °C, o que, ainda

de acordo com Heath e Downey, também gera respostas mais robustas (faixa 0-5 °C); (3) não demandou aos participantes prenderem a respiração – escolha feita devido a idade avançada dos pacientes e uma vez que Khurana et al. (1980), Trouerbach et al. (1994) e Reyner et al. (2000) mostraram que a apneia não influencia significativamente as variações em FC durante o DR; (4) evitou possível evocação do reflexo oculocardíaco conforme sugerido por Reyners et al. e por Stemper et al. (2002), mesmo embora os estudos tenham apontado interferência não significativa do reflexo oculocardíaco no DR; (5) permitiu familiarizar o participante com o estímulo frio antes de executar a coleta de dados, conforme sugerido por Heath e Downey e por Reyners et al. para minimização de viés; e (6) aplicou o estímulo frio por 180 s, tempo que se mostrou satisfatório para análise de 12 índices de *ultra-short* HRV de 170 s.

De acordo com nossos dados (Tabela 3), o CFT foi capaz de mimetizar a imersão facial em água (sem prender a respiração) e evocar o DR nos pacientes sem CAN (grupos Controle e DMCAN-) induzindo bradicardia mediada pelo aumento da atividade parassimpática cardíaca (estimulação maior do centro cardíaco-inibitório – núcleos ambíguo e motor dorsal do vago); por outro lado, comparado aos demais pacientes, o grupo DMCAN+ apresentou bradicardia significativamente reduzida e tempo de resposta lento, revelando possível grau importante de disfunção da via trigêmeo-vagal-cardíaca (principal mecanismo de evocação do DR [o TCR]) e dos mecanismos de efeitos secundários (ver Figura 17).

Em geral, os pacientes DMCAN+ apresentaram níveis mais elevados de FC (taquicardia) ao longo de todo o CFT (métricas FC_m e FC_{min}), diferenciando-se ($p < 0,05$) dos demais pacientes nas três condições de coleta (REP, DR e REC) e no DR40 (Tabela 3). Por outro lado, em nenhum momento houve diferença de FC entre os grupos DMCAN- e Controle ($p \geq 0,823$). Vale destacar que a taquicardia em repouso (e naturalmente a taquicardia no DR) é um parâmetro indicativo de CAN pois retrata redução da atividade vagal cardíaca (FISHER; TAHRANI, 2017; POP-BUSUI et al., 2017a; SPALLONE et al., 2011b; VINIK; ZIEGLER, 2007). Em nosso estudo, 2 indivíduos apresentaram FC_b > 100 bpm, ambos pacientes DMCAN+ (Tabela 1), sendo que 1 manteve a FC_m > 100 bpm até mesmo durante o DR.

A ANOVA mista (Tabela 3 e Figura 29) revelou interação significativa do DR com o status de CAN nas variáveis FC_m e Δ FC_m ($p \leq 0,001$). Embora os três grupos tenham apresentando queda da FC_m nos 40 primeiros segundos do DR (DR40), apenas os pacientes negativos para CAN mostraram respostas significativas (Δ FC_m[DR40]; Controle: $-6,4 \pm 1,72\%$, $p < 0,001$; DMCAN-: $-4,65 \pm 3,51\%$, $p < 0,001$; DMCAN+: $-2,2 \pm 2,33\%$, $p = 0,185$). Por meio de um CFT com configuração semelhante, Heath e Downey (1990) reportaram queda

de $9,25 \pm 7,10$ % na FCm no DR40 em 16 voluntários saudáveis (9 mulheres, idade entre 21-35 anos), Trouerbach et al. (1994) registraram queda de $\sim 12,2\%$ ($n = 10$ homens saudáveis, idade = $22 \pm 3,9$ anos) nos 30 primeiros segundos do DR e, mais recentemente, Choate et al. (2014) queda de $\sim 15 \pm 8\%$ em um grupo de 10 estudantes jovens saudáveis (gênero e idade não informados). A menor variação reportada em nosso estudo pode ser parcialmente relacionada à média de idade maior de nosso grupo Controle ($61,2 \pm 5,3$ anos), uma vez que há forte correlação entre a idade e a HRV (BONNEMEIER et al., 2003; CORINO et al., 2006).

Ao analisar o período completo do DR (comparação REP-DR), os dados revelaram que somente o grupo Controle manteve a bradicardia em nível significativo ($\Delta FCm[DR]$; Controle: $-3,33 \pm 2,1\%$, $p = 0,002$; DMCAN-: $-0,75 \pm 3,34\%$, $p = 0,948$). A análise das séries temporais mostrou que a FC dos pacientes Controle manteve-se baixa por mais tempo ao longo dos 170 s do DR em relação aos demais pacientes. Isso sugere possível enfraquecimento na manutenção do tônus parassimpático cardíaco já a partir dos indivíduos DMCAN- e dá indícios de início do comprometimento da via trigêmeo-vagal-cardíaca. Tal achado corrobora com relatos na literatura de que o tempo do DM e o descontrole glicêmico têm relação direta com o processo de disfunção autonômica (LOW et al., 2004; POP-BUSUI et al., 2009; VALENSI et al., 2003; YUN et al., 2018). Em nosso estudo, os pacientes DMCAN- apresentaram duração moderada de DM ($12 \pm 6,27$ anos), glicemia de jejum elevada ($157 [132-293]$ mg/dl) e HbA1c também elevada ($7,1 [6,6-10,4]$ %), significativamente diferentes do grupo Controle ($p < 0,05$).

Analisando a FCmin e $\Delta FCmin$, os dados mostraram que ambos os grupos Controle e DMCAN- tiveram redução significativa no valor da FCmin no DR40 ($p \leq 0,021$). Vale destacar que a queda da FCmin foi até maior no grupo DMCAN- (Controle vs DMCAN-, $\Delta FCmin[DR40] = -3,45 \pm 3,07\%$ vs $-4,71 \pm 4,83\%$, $p = 0,856$). Isso pode ser um indicativo de que, embora por pouco tempo, o DR foi capaz de liberar/tonificar a carga parassimpática que estava suprimida/atenuada nesses pacientes quando em estado basal (*i.e.*, no REP) (talvez por causa do início da disfunção autonômica): comparado ao Controle, o grupo DMCAN- apresentou menor *range* de variação da FCb (Controle vs DMCAN-, Razão M:m = $1,14 \pm 0,053$ vs $1,1 \pm 0,028$, $p = 0,095$, Tabela 1), contudo, ao evocar o DR, maiores entradas aferentes no centro cardioinibitório podem ter reativado o SNP gerando alargamento do *range* em FC e, consequentemente, maior $\Delta FCmin$.

Quanto aos pacientes DMCAN+, a análise das séries temporais de FC revelou efeitos cronotrópico e dromotrópico negativos significativamente reduzidos ou praticamente ausentes ao longo de todo o DR. Em alguns pacientes, em primeiro momento, é até possível visualizar

certa (*i.e.*, pequena) resposta ao estímulo. A Figura 28 b exemplifica a série temporal de FC do paciente Z (grupo DMCAN+). Nela, é possível visualizar uma queda de 3,47 bpm (-4,17%) (variável ΔPico40) 12,3 s após aplicação do estímulo frio, formando um pico de bradicardia no DR40 (paciente Z: $\text{FC}_{\text{min}}[\text{DR40}] = 79,7$ bpm). Contudo, a bradicardia não consegue ser mantida e a FC retorna para valores próximo do REP (REP vs DR40; paciente Z: $\text{FC}_{\text{m}} = 83,2$ bpm vs 81,8 bpm; DMCAN+: $\text{FC}_{\text{m}} = 88,4 \pm 12,3$ bpm vs $86,5 \pm 12,8$ bpm, $p = 0,265$).

Na avaliação de resposta rápida ao estímulo, os pacientes sem CAN apresentaram rápida bradicardia e alcançaram a $\text{FC}_{\text{min}}[\text{DR}]$ em $31,8 \pm 20,7$ s, bem diferente dos pacientes DMCAN+ que levaram o dobro do tempo ($62,3 \pm 26,8$ s, $p < 0,001$). Tais latências sustentam os estudos de Heath e Downey (1990) que reportaram 40 s como sendo o período de tempo em que indivíduos saudáveis (com as funções autonômicas cardiovasculares preservadas) apresentam o maior pico de bradicardia no DR (evocado por CFT sem prender a respiração). Em um CFT com configuração equivalente ao nosso, Reyner et al. (2000) reportaram latência mediana de 25 [11-78] s em 10 voluntários saudáveis (4 mulheres, idade = 32 [21-54] anos) e Khurana e Wu (2006) latência média de $35,8 \pm 15,8$ s ($n = 10$, 4 mulheres, idade = $29,3 \pm 8$), condizentes com a latência que encontramos.

Naturalmente, alguns pacientes Controle e DMCAN- alcançaram a $\text{FC}_{\text{min}}[\text{DR}]$ após o DR40. Embora os grupos tenham apresentado latência estatisticamente semelhante (Controle vs DMCAN-, latência = $31,8 \pm 18,3$ s vs $31,8 \pm 24,4$ s, $p = 1$), o DMCAN- demonstrou atraso maior na resposta ao estímulo. Tal observação é mais facilmente evidenciada na análise gráfica da FC_{min} e $\Delta\text{FC}_{\text{min}}$ (Figura 29 c e d): embora estatisticamente não-significante ($p = 0,285$ e $p = 0,658$, respectivamente), os grupos DMCAN+ e DMCAN- apresentaram diferença maior entre a $\text{FC}_{\text{min}}[\text{DR40}]$ e a $\text{FC}_{\text{min}}[\text{DR}]$ em comparação com o grupo Controle. Isto mostra que, embora a latência média do DMCAN- tenha ocorrido em $31,8 \pm 24,4$ s, alguns pacientes continuaram apresentando queda da FC e alcançaram FC_{min} considerável após o DR40. Esse achado reforça a suspeita de início de disfunção autonômica no DM2 antes mesmo do diagnóstico de CAN (ANG et al., 2020; FISHER; TAHRANI, 2017; POP-BUSUI et al., 2017a).

A análise do índice de Δpico40 (valores absoluto e relativo) permite avaliar o pico de bradicardia dos indivíduos, o que, por sua vez, reflete o pico de tônus parassimpático cardíaco. Os pacientes Controle apresentaram queda de $9,03 \pm 2,69$ bpm ($-12,9 \pm 2,7\%$), os pacientes DMCAN- queda de $8,07 \pm 4,35$ bpm ($-11,44 \pm 6,21\%$) e os pacientes DMCAN+ queda de $4,16 \pm 2,57$ bpm ($-4,82 \pm 2,92\%$). Tais dados reforçam as observações discutidas até aqui: livre de DM e CAN, o grupo controle apresentou tônus parassimpático cardíaco maior entre as

populações do estudo, seguido pelos pacientes DMCAN⁻ e, por último, os DMCAN⁺. Além disso, o Δ pico40 do grupo DMCAN⁺ foi 50% menor que o pico dos demais grupos, revelando possível grau importante de disfunção da via trigêmeo-vagal-cardíaca nesse grupo. Os resultados obtidos sustentam nossa hipótese de benefícios da utilização clínica do DR na avaliação de funções autonômicas cardiovasculares e detecção de CAN.

Em um CFT com configuração semelhante (e métrica equivalente a Δ pico40), Khurana et al. (1980) reportaram queda de FC de $21,4 \pm 16,6\%$ no grupo saudável ($n = 50$ [gênero não informado], idade = 33 [19–85] anos), Reyner et al. (2000) registraram queda de 12 [4-54] bpm ($15,7$ [6-55]%) e Khurana e Wu (2006) queda de $22,5 \pm 9\%$. Assim como ocorreu na FCm, os resultados mais amenos em Δ pico40 podem ser parcialmente explicados pela média de idade maior de nosso grupo Controle, uma vez que há forte relação entre a idade e a HRV (BONNEMEIER et al., 2003; CORINO et al., 2006). Em nosso estudo, a Δ pico40 foi a variável que mais se correlacionou com a idade ($\rho = 0,38$).

Triglicérides, HbA1, glicemia de jejum, quantidade de comorbidades e complicações no DM e quantidade de medicamentos para o controle do DM foram os dados que mais se correlacionaram às métricas investigadas no CFT. Ao examinar a correlação desses dados com a FCm[REP], foram encontradas correlação moderada de Triglicérides e de HbA1, e correlação regular das demais. Contudo, ao comparar os mesmos dados à FCm[DR] (ou no DR40), todos os coeficientes resultaram em correlação mais forte. Já na comparação com a FCm[REC], os coeficientes em geral voltaram apresentar menor correlação. Tais achados sugerem que o DR foi capaz de aumentar a distinção dos grupos, melhor correlacionando os achados em FC às características clínicas de cada população.

Nenhum grupo mostrou diferença em FCm e FCmin durante a REC pós-reflexo (comparação REP-REC) (Δ FCm[REC]; Controle: $1,42 \pm 2,95\%$, $p = 0,766$; DMCAN⁻: $0,097 \pm 2,45\%$, $p = 0,857$; DMCAN⁺: $-0,36 \pm 1,2\%$, $p = 0,973$). Isto mostra que, ao retirar a máscara e cessar a estimulação, os valores em FC retornaram ao nível basal (\sim FCb), confirmando as características de plausibilidade e reversibilidade do DR (MEUWLY et al., 2017b, 2017a).

A Escala de Borg para frio e dor teve *score* geral de $6,5 \pm 1,34$ pontos, sem diferença estatística entre os grupos ($p = 0,131$). Entretanto, o resultado médio do grupo DMCAN⁺ ficou 1 ponto a baixo dos demais. A percepção reduzida de frio/dor pode ser parcialmente explicada pela menor sensibilidade desses pacientes, condizente com o avanço da disfunção autonômica. Por fim, todos os pacientes consideraram refazer o CFT no futuro para reavaliação das funções autonômicas cardiovasculares e monitoramento da CAN.

5.4 ULTRA-SHORT HRV NO CFT

Nossos achados indicam HRV significativamente enfraquecida nos indivíduos positivos para CAN, tanto em períodos *ultra-short* em condições de REP quanto sob efeito de perturbações fisiológicas (*i.e.*, no DR ou durante a REC pós-reflexo), caracterizado por redução das modulações parassimpática e simpática cardíacas em comparação com a população negativa para CAN ($p < 0,05$). Além disso, alguns índices apresentaram diferenças significativamente maiores quando comparados nas condições DR e/ou REC, sustentando a hipótese de que avaliações dinâmicas resultam em acurácia diagnóstica maior (BHATI et al., 2019; MICHAEL; GRAHAM; OAM, 2017).

Literatura envolvendo a metodologia da ainda recente *ultra-short* HRV na avaliação de CAN ainda é pobre. Até onde sabemos, Wehler et al. (2021) foram os únicos até o momento a fornecer evidências científicas fortes sobre a confiabilidade de alguns índices de *ultra-short* HRV no repouso para detecção da CAN. De acordo com os autores, janelas a partir de 60 s resultaram em SDNN, RMSSD, LF e HF confiáveis. Em nosso estudo, os índices NNm, SDNN, RMSSD, TRI idx, TINN, LF, HF, SD1, SD2, SD1/SD2 e DFA $\alpha 1$ resultantes de janela de 170 s foram considerados confiáveis para a avaliação da CAN (Tabela 5) de acordo com a metodologia proposta por Shaffer, Meehan e Zerr (2020).

Em geral, os resultados da ANOVA mista (Tabela 6) indicaram diferenças nas modulações simpática (LF, SD2 e SD1/SD2; $p \leq 0,03$), parassimpática (RMSSD, HF e SD1; $p < 0,001$) e na variabilidade geral (NNm, SDNN, TRI idx, TINN e DFA $\alpha 1$; $p \leq 0,008$) ao comparar os três grupos do estudo: o Controle apresentou HRV mais forte enquanto DMCAN+ apresentou HRV mais fraca. Redução de valores de HRV é indicativo de adaptação anormal e insuficiente do SNA (MALIK et al., 1996) e é um dos primeiros sinais de CAN (POP-BUSUI et al., 2017a). Nossos achados em HRV são corroborados por Bhati et al. (2019) que relataram diminuição de NNm, RMSSD, pNN50, TP, LF, LFn, HF e HF_n ($p \leq 0,01$) em 27 pacientes positivos para CAN dos 42 DM2 que participaram do estudo (idade = $51,1 \pm 6,16$ anos, duração do DM = $7,9 \pm 5,98$ anos). Assim como em nosso trabalho, Bhati et al. usaram ANOVA mista para avaliar os pacientes em duas condições distintas: no repouso e no pós-exercício ergométrico; entretanto, os autores usaram janelas de 300 s na análise (*i.e.*, *short-term* HRV). Em ambos os trabalhos, a LF/HF não revelou diferença significativa entre os grupos, porém, diferentemente de Bhati et al., a SDNN mostrou diferenças em nosso estudo ($p < 0,001$).

Bhati et al. (2019) reportaram ainda interação (grupo \times condição) significativa em NNm, TP e LFn ($p \leq 0,03$). Já em nosso trabalho, os índices NNm e HF mostraram interação significativa do DR com o status de CAN ($p \leq 0,045$); TP e LFn não foram analisados conforme justificado anteriormente. Os resultados de Bhati et al. indicam que, no período pós-exercício, os pacientes com CAN mantiveram o NNm significativamente mais reduzido e o LFn significativamente mais elevado em comparação com o grupo sem CAN, refletindo o atraso do retorno vagal naqueles pacientes (característico da CAN). Da mesma forma, porém em sentido inverso, nossos dados mostraram que durante o DR o grupo DMCAN+ apresentou fraco aumento em NNm e que apenas os pacientes sem CAN tiveram elevação significativa da HF em resposta ao DR (REP vs DR; Controle: HF = $2,35 \pm 0,28 \log \text{ms}^2$ vs $2,42 \pm 0,22 \log \text{ms}^2$, $p = 0,023$; DMCAN-: HF = $2,01 \pm 0,2 \log \text{ms}^2$ vs $2,21 \pm 0,33 \log \text{ms}^2$, $p = 0,005$; DMCAN+: HF = $0,96 \pm 0,4 \log \text{ms}^2$ vs $1,1 \pm 0,47 \log \text{ms}^2$, $p = 0,126$) (Tabela 6). Esses dados reforçam nossa suspeita de disfunção importante da via trigêmeo-vagal-cardíaca em decorrência da CAN.

Ainda comparando as condições REP-DR, o grupo DMCAN- apresentou elevação significativa em RMSSD ($p = 0,03$) e em SD1 ($p = 0,034$) (além de HF) em resposta ao reflexo. O aumento significativo desses três exatos índices apenas nos pacientes DMCAN- sustenta a hipótese levantada anteriormente de que o DR liberou (e tonificou) a carga parassimpática que estava suprimida nesses pacientes durante o REP. Além disso, os índices SDNN, TRI idx, TINN, SD2 e HF, todos com valores significativamente diferentes do grupo Controle nas condições REP e REC ($p < 0,05$), deixaram de apresentar diferença estatística na comparação dos grupos quando sob efeito do DR. Esses achados sugerem que o DR elevou não só o tônus parassimpático, mas a carga autonômica geral que estava atenuada/suprimida nos pacientes DMCAN- durante o REP, reforçando nossa hipótese de possível enfraquecimento da modulação autonômica basal nos pacientes DMCAN-.

Fora NNm e HF, nenhuma outra medida de HRV do grupo Controle apresentou diferença estatística significativa em resposta à aplicação do DR (*i.e.*, comparação REP-DR) (Tabela 6), limitando nossas referências para avaliação das vias trigêmeo-SNA-cardíacas. Em termos de valores, entretanto, é notável uma variação geral nos índices dos pacientes sem CAN (e em alguns casos, também dos pacientes com CAN [porém menores]) (Figura 30). Tais variações ocorreram tanto em medidas que refletem a modulação do SNP quanto nas que refletem a do SNS, dando indícios da presença das funções trigêmeo-vagal-cardíaca e trigêmeo-simpática-cardíaca. Acreditamos que com um número amostral maior seria possível evidenciar efeitos principais maiores e interações significativas do DR e CAN em outros índices de HRV.

Em termos de desempenho diagnóstico (Tabela 7), a maioria das medidas demonstrou desempenho superior quando sob efeito das perturbações fisiológicas (*i.e.*, no DR ou durante a REC pós-reflexo); apenas RMSSD e TRI idx foram menores (minimamente) no DR (AUC; REP vs DR; RMSSD = 0,99 vs 0,98, $p = 0,563$; TRI idx = 0,97 vs 0,96, $p = 0,749$) (APÊNDICE C). A acurácia diagnóstica (AC) de DFA $\alpha 1$ foi significativamente maior na comparação REP-DR ($p = 0,041$), e a AC de SD1/SD2 significativamente maior na comparação REP-REC ($p = 0,017$) (APÊNDICE C). Acreditamos que as análises comparativas das curvas ROC dos outros índices de HRV também poderiam resultar em diferenças significativas se a amostragem do estudo fosse maior.

Em condições basais, valores de DFA $\alpha 1$ próximos de 1,0 indicam balanceamento de curto prazo saudável da série de FC, enquanto valores distantes de 1,0 refletem perda de oscilação periódica e complexidade: valores decrescentes indicam maior aleatoriedade e desorganização, e valores crescentes indicam comportamento mais padronizado e pouca variação. Como a redução da HRV é um dos primeiros sinais de CAN, os pacientes DMCAN+ apresentaram DFA $\alpha 1$ elevada já durante o REP, medida que aumentou ainda mais durante o DR e a REC superando significativamente os pacientes sem CAN que, de forma inversa, apresentaram queda de DFA $\alpha 1$ no DR: como em situações saudáveis o DR (sem o cessar da respiração) causa forte bradicardia seguida por retorno aos níveis basais após 40 s de estimulação, espera-se que as séries de FC dos pacientes sem CAN sejam mais dinâmicas e aleatórias durante o DR do que no REP e na REC; evidencia observada neste estudo. Por apresentarem respostas em sentidos opostos, a AC de DFA $\alpha 1$ foi significativamente maior na análise comparativa das curvas ROC REP-DR ($p = 0,041$) e consideravelmente maior na análise comparativa REP-REC ($p = 0,054$).

Assim como SD1/SD2, a relação LF/HF também apresentou AC diferente na análise comparativa das curvas ROC REP-REC, embora estatisticamente não significativa ($p = 0,077$) (APÊNDICE C). Ambos índices refletem o balanço simpático-parassimpático dos pacientes. Com a evocação do DR, espera-se tonificação e predominância da atividade parassimpática cardíaca sobre a simpática cardíaca, causando elevação de SD1/SD2 e redução de LF/HF, seguido por retorno dos valores para próximos dos níveis basais quando na REC. Contudo, a CAN e o comprometimento vagal podem levar a uma predominância geral da atividade simpática no balanço simpático-parassimpático (JELINEK et al., 2017; POP-BUSUI et al., 2017a), resultando em balanços significativamente diferentes entre os grupos. Tais diferenças foram observadas principalmente no índice SD1/SD2 cuja análise comparativa das curvas ROC

resultou em AC consideravelmente maior entre REP-DR ($p = 0,099$) e significativamente maior entre REP-REC ($p = 0,017$), revelando que o período inicial de REC dos DMCAN+ foi marcado por forte desativação da atividade parassimpática mediada pelo DR. Vale destacar que LF/HF foi a única medida dos pacientes DMCAN+ que mostrou diferença significativa na ANOVA mista e que essa diferença ocorreu entre as condições DR-REC (DR vs REC; LF/HF = $0,1 \pm 0,48 \log \text{ms}^2$ vs $0,27 \pm 0,59 \log \text{ms}^2$, $p = 0,029$) (Tabela 6 e Figura 30).

Estudos anteriores demonstraram boa acurácia diagnóstica da HRV na detecção de CAN no DM2 (BHATI et al., 2019; CHEN et al., 2015; JELINEK et al., 2017); contudo, apenas Bhati et al. exploram condições também fora do repouso. Os autores reportaram AC média dos índices no REP = 75,7% e AC média dos índices no pós-exercício ergométrico = 79,5% (aumento de 3,8 pontos percentuais). Chen et al (2015) reportaram AC média no REP = 85%. Nosso estudo resultou em AC média no REP = 88%, DR = 92,5% e REC = 92,5% (aumento de 4,5 pontos percentuais), com especificidade maior no DR e sensibilidade maior na REC. Os valores médios de especificidade dos 12 índices de HRV foram maiores que os valores médios de sensibilidade nas três condições de análise estudadas. Isso pode ser parcialmente explicado pela quantidade maior (3x) de pacientes sem CAN ($n = 24$) comparada aos com CAN ($n = 8$) do nosso estudo, o que impacta o escalonamento percentil da variável sensibilidade uma vez que foi escolhido trabalhar com o índice de Youden de valor mais elevado como ponto de corte para cálculo da AUC na análise das curvas ROC. Acreditamos que a inclusão de uma amostra maior da população DMCAN+ aumentariam o percentil de sensibilidade em relação ao de especificidade na análise das curvas ROC.

Assim, como nos trabalhos de Bhati et al. (2019), os resultados em AC de nosso estudo mostraram que o SNA é mais responsivo quando sob efeito de perturbações fisiológicas, reafirmando a importância e o benefício diagnóstico de incluir avaliações dinâmicas de HRV nos testes clínicos de investigação da CAN em pacientes DM2. Além disso, o DR mostrou-se um recurso efetivo e seguro para gerar carga autonômica nos pacientes, permitindo avalia-los não somente no período pós-reflexo, mas durante o próprio momento de aplicação do estímulo.

5.5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Diante do que foi desenvolvido, o presente estudo apresentou algumas limitações:

- Embora a taxa de prevalência tenha sido satisfatória, nosso estudo envolveu um número amostral baixo da população DM2 ($n = 20$), resultando em apenas 8

pacientes positivos para CAN. A baixa amostragem comprometeu o poder de representatividade das populações e impactou o tamanho de efeito das análises, gerando limitações conclusivas; por isto, seu objetivo é ser um estudo preliminar.

- Acreditamos que as preocupações e incertezas com a COVID-19 foram as principais causas para a alta taxa de resistência e desistência na participação. Em um cenário mais controlado, pós-aplicação da dose vacinal de reforço e sem o surto de uma nova variante do vírus, as pessoas provavelmente estariam mais susceptíveis a participar da pesquisa.
- Ainda devido ao número baixo de amostras, vimos a necessidade de juntar os pacientes positivos para CAN subclínica ($n = 3$) com os pacientes positivos para CAN estabelecida ($n = 5$) para formação do grupo DMCAN+. Desconsiderar o estágio da CAN, entretanto, pode encobrir algumas características intrínsecas do processo de disfunção autonômica e limitar a investigação sobre o benefício de usar o DR na avaliação de funções autonômicas e detecção da CAN.
- O CFT desenvolvido foi capaz de evocar o DR e induzir bradicardia nos pacientes sem CAN. Contudo, conforme apresentado, as respostas em FC foram quase 50% menores que alguns valores reportados na literatura. Tal fato pode ser parcialmente explicado pela média de idade maior de nosso grupo Controle. Contudo, além da idade, a máscara em gel utilizada no CFT não conseguiu segurar a temperatura em $0-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por muito tempo; ao final da condição DR (170 s), a temperatura final da máscara (T_{mf}) medida na região paranasal (principal ponto de gatilho do DR) foi de $10,8 \pm 0,9\text{ }^{\circ}\text{C}$. Acreditamos que a fraca manutenção da temperatura fria teve contribuição para as menores respostas em FC.
- Neste estudo, as métricas escolhidas permitiram avaliar a via trigêmeo-vagal-cardíaca por meio das respostas em FC, dando respaldo investigativo quanto à atividade parassimpática mediada pelo DR na CAN, enquanto que a análise mais específica dos índices HF, LF/HF, SD2 e SD1/SD2 deram informações sobre a via trigêmeo-simpática-cardíaca, embora com certa limitação. Por outro lado, nenhuma métrica relacionada à RPT foi utilizada no trabalho, inviabilizando a avaliação da via trigêmeo-simpática-vascular periférica, o que deixa incompleta a investigação da atividade simpática mediada pelo DR na CAN.

6 CONCLUSÕES

O DM2 é uma das emergências em saúde que mais crescem no Brasil e no mundo. Dentre as complicações diabéticas mais prevalentes, a CAN tem se mostrado preditora independente de mortalidade e fator de risco para progressão DCVs e outras comorbidades associadas; controversamente, é também a complicação mais subdiagnosticada no DM. Uma vez detectada, entretanto, é possível adotar medidas para retardar sua progressão e ainda estratificar o grau de risco cardiovascular do paciente, permitindo reduzir a frequência de eventos cardiovasculares maiores.

Visando a detecção da CAN no DM2, nosso objetivo foi estudar a utilidade clínica do DR na avaliação de funções autonômicas cardiovasculares como metodologia complementar aos CARTs. O CFT desenvolvido se mostrou um método simples, seguro e capaz de evocar o DR; não exigiu apneia nem demandou a participação ativa dos pacientes (manobra passiva), assim, não restringiu a participação daqueles com limitação física, glaucoma ou retinopatia diabética (diferentemente dos CARTs), permitindo avaliar de forma dinâmica as funções autonômicas cardiovasculares de todos os pacientes. Contudo, vale destacar que este foi um estudo de caráter preliminar; os resultados obtidos e as hipóteses levantadas precisam ser reavaliados em análises com tamanho de efeito maior.

A aplicação do DR impôs carga autonômica significativa nos pacientes sem CAN (Controle e DMCAN-), induzindo bradicardia mediada pelo aumento da modulação parassimpática cardíaca; por outro lado, os pacientes com CAN (DMCAN+) apresentaram FC elevada tanto em situações basais como quando sob efeito do DR, com bradicardia significativamente reduzida (Δ pico40 ~50% menor) e tempo de resposta lento (~2x a latência), sugerindo grau de disfunção importante da via trigêmeo-vagal-cardíaca. As análises aprofundadas em HRV ressaltaram as evidências de modulação parassimpática cardíaca enfraquecida e revelaram modulação simpática cardíaca também reduzida nos pacientes com CAN em comparação aos sem CAN.

Nossos achados em FC e HRV sugeriram ainda redução dos níveis basais nos pacientes DM2 negativos para CAN (DMCAN-) e falha do SNP na manutenção prolongada do tônus parassimpático cardíaco mediado pelo DR (tempo de bradicardia reduzido) em comparação ao grupo Controle, sugerindo início de enfraquecimento da função parassimpática antes mesmo do diagnóstico de CAN. Sob a suposição de que a CAN progride cronologicamente de precoce para disfunção definitiva e grave, pode-se, portanto, levantar a hipótese de que a análise

dinâmica do SNA em resposta ao DR foi capaz de descobrir alterações mais sutis encontradas no início da disfunção e que passariam despercebidas nos DMCAN– se a triagem fosse realizada apenas na condição de repouso.

De modo geral, as análises comparativas das curvas ROC mostraram desempenho diagnóstico superior em quase todos os índices de HRV no DR e durante a REC pós-reflexo, com acurácia diagnóstica significativamente mais elevada em DFA $\alpha 1$ ($p = 0,041$) e SD1/SD2 ($p = 0,017$) para detecção de CAN, sustentando evidências que o SNA é mais responsivo quando sob efeito de perturbações fisiológicas e sugerindo a inclusão de avaliações dinâmicas de HRV nos testes clínicos de investigação da CAN. Além disso, o DR mostrou ser um recurso efetivo e seguro para gerar carga autonômica nos pacientes, permitindo fazer avaliações dinâmicas não apenas no período pós-reflexo, mas durante o próprio momento de evocação do DR, uma vez que o CFT não requer participação ativa dos pacientes.

Por fim, até onde sabemos, este foi o primeiro estudo investigativo de CAN que fez uso de 12 índices de *ultra-short* HRV no repouso com confiabilidade confirmada; o primeiro estudo que fez uso de *ultra-short* HRV sob efeito de perturbações fisiológicas; um dos primeiros estudos a investigar a utilidade clínica do DR na avaliação de funções autonômicas cardiovasculares no DM2; e o primeiro estudo a aplicar o DR com caráter de investigação científica em uma amostra da população meia-idade e sênior (idade média de 60 anos).

6.1 TRABALHOS FUTUROS

- Trabalhos futuros deveriam considerar um número amostral maior para formação dos grupos, o que resultaria em análises com tamanho de efeito maior e conclusões mais fundamentadas. Além disso, deveriam considerar a possibilidade de separar os pacientes positivos para CAN em subgrupos de acordo com o estágio de disfunção (precoce, estabelecida e grave). Isto permitiria representar mais corretamente as populações e estudar os diferentes efeitos e tempo de resposta do DR no processo de disfunção autonômica, auxiliando, talvez, na identificação e diagnóstico mais precoce da CAN.
- Visando cargas fisiológicas maiores, seria ideal desenvolver um método de resfriamento que mantenha a face constante em 0-5 °C ao longo da estimulação, talvez um jato de ar úmido e frio (porém evitando sua inalação). Além disso, a literatura reporta que o cessar da respiração é um mecanismo importante para

evocação do DR e promoção dos ajustes fisiológicos, por isto, dependendo do delineamento do estudo, é interessante incluir apneia na metodologia.

- Métricas em RPT (como a série temporal da PAM ou do FS periférico) permitiriam, junto às métricas em FC, melhor avaliar a evocação e a intensidade do DR. O uso das métricas em RPT possibilitariam ainda avaliar o SNS mais completamente pois refletem informações quanto a via trigêmeo-simpática-vascular periférica, análise que não foi feita neste estudo. De acordo com a revisão da literatura, a bradicardia e o aumento da RPT são as duas principais respostas fisiológicas do DR (co-ativação do SNP e do SNS).
- Neste estudo, as fases do CFT foram analisados em momentos isolados: REP ou DR ou REC. Estudos futuros poderiam considerar os momentos de transição, como uma janela de varredura (tamanho variado, mediante confirmação de confiabilidade para os índices selecionados) que percorre os 9 min da coleta resultando em um vetor de medidas para cada um dos índices de HRV, permitindo identificar as variações fisiológicas ao longo de todo o CFT: início, meio e fim do DR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACAR, B. et al. Automatic ectopic beat elimination in short-term heart rate variability measurement. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 63, n. 2, p. 123–131, 2000.

AGASHE, S.; PETAK, S. Cardiac Autonomic Neuropathy in Diabetes Mellitus. v. 14, n. 4, 2018.

AGELINK, M. W. et al. Standardized tests of heart rate variability: normal ranges obtained from 309 healthy humans, and effects of age, gender, and heart rate. **Clinical Autonomic Research**, v. 11, n. 2, p. 99–108, abr. 2001.

AKOGLU, H. User's guide to correlation coefficients. **Turkish Journal of Emergency Medicine**, v. 18, n. 3, p. 91–93, 2018.

ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. **Diabetic Medicine**, v. 15, n. 7, p. 539–553, 1998.

ALBONI, P.; ALBONI, M.; GIANFRANCHI, L. Diving bradycardia: A mechanism of defence against hypoxic damage. **Journal of Cardiovascular Medicine**, v. 12, n. 6, p. 422–427, 2011.

ALSALAH, S. E. et al. Human cerebrovascular responses to diving are not related to facial cooling. **Experimental Physiology**, v. 105, n. 6, p. 940–949, 2020.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2020. **Diabetes Care**, v. 43, n. Supplement 1, p. S14–S31, 20 jan. 2020.

ANG, L. et al. Cardiovascular autonomic neuropathy: A silent killer with long reach. **Autonomic Neuroscience**, v. 225, p. 102646, maio 2020.

ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrinologia básica e aplicada. In: **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 611.

ARASHO, B. et al. Management of the trigeminocardiac reflex: facts and own experience. **Neurology India**, v. 57, n. 4, p. 375–380, 2009.

ARGACHA, J. F. et al. Facial cooling and peripheral chemoreflex mechanisms in humans. **Acta Physiologica**, v. 194, n. 2, p. 161–170, 2008.

ARIZA, R. C.; BURGOS, G.; FRATI, A. C. Face immersion reflex for diagnosis of diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. **Archives of medical research**, v. 26, n. 3, p. 227–31, 1995.

ARMSTRONG, T.; BULL, F. Development of the World Health Organization Global Physical Activity Questionnaire (GPAQ). **Journal of Public Health**, v. 14, n. 2, p. 66–70, 2

abr. 2006.

BALCIOĞLU, A. S.; MÜDERRISOĞLU, H. Diabetes and cardiac autonomic neuropathy: Clinical manifestations, cardiovascular consequences, diagnosis and treatment. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 1, p. 80, 2015.

BANTHIA, S. et al. Detection of cardiovascular autonomic neuropathy using exercise testing in patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 27, n. 1, p. 64–69, 2013.

BERNARDI, L. et al. Methods of investigation for cardiac autonomic dysfunction in human research studies. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 27, n. 7, p. 654–664, out. 2011.

BERNTSON, G. G. et al. Heart rate variability: origins, methods, and interpretive caveats. **Psychophysiology**, v. 34, n. 6, p. 623–648, nov. 1997.

BHAGYALAKSHMI, S. et al. Effect of supervised integrated exercise on heart rate variability in type 2 diabetes mellitus. **Kardiologia polska**, v. 65, n. 4, p. 363–8; discussion 369, abr. 2007.

BHATI, P. et al. Diagnostic performance of resting and post-exercise heart rate variability for detecting cardiac autonomic neuropathy in type 2 diabetes mellitus. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 219, n. July 2018, p. 53–65, 2019.

BHATI, P.; HUSSAIN, M. E. Inconsistency amongst the diagnostic criteria based on Ewing's tests for diagnosing cardiac autonomic neuropathy in diabetes mellitus: an under-rated issue. **Clinical Diabetology**, v. 9, n. 4, p. 269–270, 26 ago. 2020.

BISSINGER, A. Cardiac Autonomic Neuropathy: Why Should Cardiologists Care about That? **Journal of Diabetes Research**, v. 2017, n. Article ID5374176, p. 1–9, 2017.

BLANC, V. F. et al. The oculocardiac reflex: a graphic and statistical analysis in infants and children. **Canadian Anaesthetists' Society journal**, v. 30, n. 4, p. 360–369, jul. 1983.

BLANKENSHIP, G. W. Diabetic retinopathy, present and future. Conclusion of diabetic retinopathy symposium. **Ophthalmology**, v. 88, n. 7, p. 658–661, jul. 1981.

BONNEMEIER, H. et al. Circadian Profile of Cardiac Autonomic Nervous Modulation in Healthy Subjects: **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**, v. 14, n. 8, p. 791–799, 22 ago. 2003.

BORG, G. G. **Borg Rate of Perceived Pain Scale**. Champaign, IL: Human Kinetics, 1998.

BOULTON, A. J. M. et al. Diabetic Neuropathies: A statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 28, n. 4, p. 956–962, 1 abr. 2005.

BUTTERWORTH, J. S.; THORPE, J. J. On Evaluating the Einthoven Triangle Theory. **Circulation**, v. 3, n. 6, p. 923–925, jun. 1951.

CÉSAR, L. A. M. Corrente If e o controle da frequência cardíaca. **Arquivos Brasileiros de**

Cardiologia, v. 88, n. 4, p. e99–e102, abr. 2007.

CHAN, Y. H. Biostatistics 104: correlational analysis. **Singapore medical journal**, v. 44, n. 12, p. 614–9, dez. 2003.

CHEN, H.-T. et al. Cardiovascular autonomic neuropathy, autonomic symptoms and diabetic complications in 674 type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 82, n. 2, p. 282–290, nov. 2008.

CHEN, J. et al. Diagnostic performance analysis for diabetic cardiovascular autonomic neuropathy based on short-term heart rate variability using Bayesian methods: Preliminary analysis. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2015.

CHESSA, M. et al. Role of Heart Rate Variability in the Early Diagnosis of Diabetic Autonomic Neuropathy in Children. **Herz**, v. 27, n. 8, p. 785–790, 1 dez. 2002.

CHOATE, J. K. et al. Using stimulation of the diving reflex in humans to teach integrative physiology. **Advances in Physiology Education**, v. 38, n. 4, p. 355–365, 2014.

CHOWDHURY, T. et al. Trigemino-cardiac reflex: differential behavior and risk factors in the course of the trigeminal nerve. **Future Neurology**, v. 9, n. 1, p. 41–47, 2014.

CHOWDHURY, T. et al. Trigemino-cardiac reflex: the current clinical and physiological knowledge. **Journal of neurosurgical anesthesiology**, v. 27, n. 2, p. 136–147, abr. 2015.

CHOWDHURY, T.; SCHALLER, B. The role of acute trigemino-cardiac reflex in unusual, non-surgical cases: A review. **Frontiers in Neurology**, v. 7, n. OCT, p. 1–3, 2016.

CLELAND, C. L. et al. Validity of the Global Physical Activity Questionnaire (GPAQ) in assessing levels and change in moderate-vigorous physical activity and sedentary behaviour. **BMC Public Health**, v. 14, n. 1, p. 1255, 10 dez. 2014.

CORINO, V. D. A. et al. Long-term heart rate variability as a predictor of patient age. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 82, n. 3, p. 248–257, jun. 2006.

CORNELIUS, J. F. et al. The trigemino-cardiac reflex in adults: Own experience. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 8, n. 7, p. 895–898, 2010.

DAVEY, P.; SHARMAN, D. The electrocardiogram. **Medicine (United Kingdom)**, v. 46, n. 8, p. 443–452, 2018.

DELONG, E. R.; DELONG, D. M.; CLARKE-PEARSON, D. L. Comparing the Areas under Two or More Correlated Receiver Operating Characteristic Curves: A Nonparametric Approach. **Biometrics**, v. 44, n. 3, p. 837, set. 1988.

DUNCAN, B. B. et al. The burden of diabetes and hyperglycemia in Brazil-past and present: findings from the Global Burden of Disease Study 2015. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 9, n. 1, 2017.

DYCK, P. J. et al. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: The Rochester Diabetic

- Neuropathy Study. **Neurology**, v. 43, n. 4, p. 817–817, 1 abr. 1993.
- EINTHOVEN, W. The telecardiogram. **American Heart Journal**, v. 53, n. 4, p. 602–615, abr. 1957.
- ESCO, M. R.; FLATT, A. A. Ultra-short-term heart rate variability indexes at rest and post-exercise in athletes: Evaluating the agreement with accepted recommendations. **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 13, n. 3, p. 535–541, 2014.
- EWING, D. J. et al. The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. **Diabetes Care**, v. 8, n. 5, p. 491–498, 1985.
- EWING, D. J. et al. Twenty four hour heart rate variability: effects of posture, sleep, and time of day in healthy controls and comparison with bedside tests of autonomic function in diabetic patients. **Heart**, v. 65, n. 5, p. 239–244, 1 maio 1991.
- EWING, D. J.; CAMPBELL, I. W.; CLARKE, B. F. Assessment of cardiovascular effects in diabetic autonomic neuropathy and prognostic implications. **Annals of Internal Medicine**, v. 92, n. 2 II, p. 308–311, 1980.
- FAUST, O. et al. Linear and non-linear analysis of cardiac health in diabetic subjects. **Biomedical Signal Processing and Control**, v. 7, n. 3, p. 295–302, 2012.
- FERGUSON, J. D.; DIMARCO, J. P. Contemporary Management of Paroxysmal Supraventricular Tachycardia. **Circulation**, v. 107, n. 8, p. 1096–1099, 4 mar. 2003.
- FISHER, V. L.; TAHRANI, A. A. Cardiac autonomic neuropathy in patients with diabetes mellitus: current perspectives. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. Volume 10, p. 419–434, out. 2017.
- FOSTER, G. E.; SHEEL, A. W. The human diving response, its function, and its control. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 15, n. 1, p. 3–12, 2005.
- FRANÇA DA SILVA, A. K. et al. Application of Heart Rate Variability in Diagnosis and Prognosis of Individuals with Diabetes Mellitus: Systematic Review. **Annals of Noninvasive Electrocardiology**, v. 21, n. 3, p. 223–235, maio 2016.
- GODEK, D.; FREEMAN, A. M. **Physiology, Diving Reflex**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2019.
- GOODEN, B. A. Mechanism of the human diving response. **Integrative Physiological and Behavioral Science**, v. 29, n. 1, p. 6–16, jan. 1994.
- GORDAN, R.; GWATHMEY, J. K.; XIE, L.-H. Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. **World Journal of Cardiology**, v. 7, n. 4, p. 204, 2015.
- GRONWALD, T.; ROGERS, B.; HOOS, O. Fractal Correlation Properties of Heart Rate Variability : A New Biomarker for Intensity Distribution in Endurance Exercise and Training Prescription ? v. 11, n. September, p. 1–11, 2020.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. [s.l.] Elsevier, 2011.

HAJIAN-TILAKI, K. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 4, n. 2, p. 627–635, 2013.

HAMILTON, W. F.; MAYO, J. P. CHANGES IN THE VITAL CAPACITY WHEN THE BODY IS IMMERSSED IN WATER. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 141, n. 1, p. 51–53, 1 mar. 1944.

HARDING, P. E.; ROMAN, D.; WHELAN, R. F. Diving bradycardia in man. **The Journal of Physiology**, v. 181, n. 2, p. 401–409, 1 nov. 1965.

HEATH, M. E.; DOWNEY, J. A. The cold face test (diving reflex) in clinical autonomic assessment: methodological considerations and repeatability of responses. **Clinical Science**, v. 78, n. 2, p. 139–147, 1990.

HEUSSER, K. et al. Cardiovascular regulation during apnea in elite divers. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 53, n. 4, p. 719–724, abr. 2009.

HILZ, M. J. et al. Cold face test demonstrates parasympathetic cardiac dysfunction in familial dysautonomia. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 276, n. 6 45-6, p. 1833–1839, 1999.

IAZZO, P. A.; LASKE, T. G. Anatomy and Physiology of the Cardiac Conduction System. In: **Cardiac Electrophysiology Methods and Models**. Boston, MA: Springer US, 2010. p. 73–89.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 9th. ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2019.

JELINEK, H. F. et al. Diagnostic Accuracy of Random ECG in Primary Care for Early, Asymptomatic Cardiac Autonomic Neuropathy. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 11, n. 6, p. 1165–1173, 13 nov. 2017.

KAPLAN BERKAYA, S. et al. A survey on ECG analysis. **Biomedical Signal Processing and Control**, v. 43, p. 216–235, 1 maio 2018.

KEATING, X. D. et al. Reliability and Concurrent Validity of Global Physical Activity Questionnaire (GPAQ): A Systematic Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 21, p. 4128, 26 out. 2019.

KHURANA, R. K. et al. Cold face test in the assessment of trigeminal-brainstem- vagal function in humans. **Annals of Neurology**, v. 7, n. 2, p. 144–149, 1980.

KHURANA, R. K.; WU, R. The cold face test: A non-baroreflex mediated test of cardiac vagal function. **Clinical Autonomic Research**, v. 16, n. 3, p. 202–207, 2006.

KLIGFIELD, P. et al. Recommendations for the Standardization and Interpretation of the Electrocardiogram. **Circulation**, v. 115, n. 10, p. 1306–1324, 13 mar. 2007.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy : Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

- KÖREI, A. E. et al. Why Not to Use the Handgrip Test in the Assessment of Cardiovascular Autonomic Neuropathy Among Patients with Diabetes Mellitus? **Current vascular pharmacology**, v. 15, n. 1, p. 66–73, 2017.
- KUMADA, M.; DAMPNEY, R. A. L.; REIS, D. J. The trigeminal depressor response: A novel vasodepressor response originating from the trigeminal system. **Brain Research**, v. 119, n. 2, p. 305–326, jan. 1977.
- LAPI, D. Chapter 3 - The Trigeminal Nerve and the Autonomous Nerve System: Physiological Considerations. In: CHOWDHURY, T.; SCHALLER, B. J. (Eds.). . **Trigemino-cardiac Reflex**. Boston: Academic Press, 2015. p. 37–49.
- LEMAITRE, F.; SCHALLER, B. J. The Trigemino-cardiac Reflex: A Comparison with the Diving Reflex in Humans. **Trigemino-cardiac Reflex**, p. 193–206, 2015.
- LIN, K. et al. Combination of Ewing test, heart rate variability, and heart rate turbulence analysis for early diagnosis of diabetic cardiac autonomic neuropathy. **Medicine (United States)**, v. 96, n. 45, p. 1–5, 2017.
- LONN, E. M. et al. Heart rate is associated with increased risk of major cardiovascular events, cardiovascular and all-cause death in patients with stable chronic cardiovascular disease: An analysis of ONTARGET/TRANSCEND. **Clinical Research in Cardiology**, v. 103, n. 2, p. 149–159, 2014.
- LOOGA, R. The Valsalva manoeuvre--cardiovascular effects and performance technique: a critical review. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 147, n. 1, p. 39–49, maio 2005.
- LOW, P. A. et al. Autonomic Symptoms and Diabetic Neuropathy: A population-based study. **Diabetes Care**, v. 27, n. 12, p. 2942–2947, 1 dez. 2004.
- MALIK, M. et al. Heart Rate Variability. Standards of Measurement, Physiological Interpretation, and Clinical Use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. **Circulation**, v. 93, n. 5, p. 1043–1065, 1 mar. 1996.
- MANDREKAR, J. N. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 5, n. 9, p. 1315–1316, 2010.
- MANLEY, L. Apnoeic heart rate responses in humans. A review. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 9, n. 5, p. 286–310, maio 1990.
- MARIEB, E. N.; WIELM, P. B.; MALLATT, J. **Anatomia Humana**. 7. ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2014.
- MATTURRI, L.; OTTAVIANI, G.; LAVEZZI, A. M. Sudden infant death triggered by dive reflex. **Journal of Clinical Pathology**, v. 58, n. 1, p. 77–80, 2005.
- MCCULLOCH, P. F. Animal models for investigating the central control of the Mammalian diving response. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 169, 2012.
- MCCULLOCH, P. F. et al. Innervation of the Nose and Nasal Region of the Rat: Implications

for Initiating the Mammalian Diving Response. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 12, p. 85, 2018.

MENDIVIL, C. O. et al. Neuropad for the detection of cardiovascular autonomic neuropathy in patients with type 2 diabetes. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 30, n. 1, p. 93–98, jan. 2016.

METELKA, R. et al. Heart rate variability evaluation in the assessment of cardiac autonomic neuropathy in patients with type 2 diabetes. **Cor et Vasa**, v. 60, n. 4, p. e335–e344, 2018.

MEUWLY, C. et al. Trigeminal cardiac reflex: New thinking model about the definition based on a literature review. **Medicine (United States)**, v. 94, n. 5, p. e484, 2015.

MEUWLY, C. et al. The clinical surrogate definition of the trigeminocardiac reflex: Development of an optimized model according to a PRISMA-compliant systematic review. **Medicine (United States)**, v. 96, n. 49, p. 1–8, 2017a.

MEUWLY, C. et al. Definition and diagnosis of the trigeminocardiac reflex: A grounded theory approach for an update. **Frontiers in Neurology**, v. 8, n. OCT, p. 533, 2017b.

MICHAEL, S.; GRAHAM, K. S.; OAM, G. M. D. Cardiac autonomic responses during exercise and post-exercise recovery using heart rate variability and systolic time intervals—a review. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. MAY, p. 1–19, 2017.

MUNOZ, M. L. et al. Validity of (Ultra-)Short Recordings for Heart Rate Variability Measurements. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0138921, 28 set. 2015.

NARDELLI, M. et al. Reliability of lagged poincaré plot parameters in ultrashort heart rate variability series: Application on affective sounds. **IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics**, v. 22, n. 3, p. 741–749, 2018.

NETO, J. E.; SEISDEDOS, C. R. V. **Influence of High Pass Filtering on the T-wave End Estimation BT - VI Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB 2014, Paraná, Argentina 29, 30 & 31 October 2014.** (A. Braidot, A. Hadad, Eds.) Cham: Springer International Publishing, 2015

O'BRIEN, I. A. D.; CORRALL, R. J. M. Cardiovascular Autonomic Function Testing: An Automated Method for Measuring Heart Rate Variation. **Diabetic Medicine**, v. 2, n. 2, p. 143–144, 7 mar. 1985.

O'BRIEN, I. A. D.; O'HARE, P.; CORRALL, R. J. M. Heart rate variability in healthy subjects: effect of age and the derivation of normal ranges for tests of autonomic function. **Br Heart J**, v. 55, p. 348–54, 1986.

PANNETON, W. M. The mammalian diving response: an enigmatic reflex to preserve life? **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 28, n. 5, p. 284–297, set. 2013.

PATEL, K.; HORAK, H.; TIRYAKI, E. Diabetic neuropathies. **Muscle & Nerve**, n. June, p. mus.27014, 28 jul. 2020.

PEDROSO, F. S. et al. The diving reflex in healthy infants in the first year of life. **Journal of**

child neurology, v. 27, n. 2, p. 168–171, fev. 2012.

PEREIRA, T. et al. Heart rate variability metrics for fine-grained stress level assessment. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 148, p. 71–80, 2017.

PFEIFER, M. A. et al. Autonomic Neural Dysfunction in Recently Diagnosed Diabetic Subjects. **Diabetes Care**, v. 7, n. 5, p. 447–453, 1 set. 1984.

POP-BUSUI, R. et al. Effects of Prior Intensive Insulin Therapy on Cardiac Autonomic Nervous System Function in Type 1 Diabetes Mellitus. **Circulation**, v. 119, n. 22, p. 2886–2893, 9 jun. 2009.

POP-BUSUI, R. et al. Effects of Cardiac Autonomic Dysfunction on Mortality Risk in the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) Trial AND THE ACCORD STUDY GROUP*. 2010.

POP-BUSUI, R. et al. Diabetic neuropathy: A position statement by the American diabetes association. **Diabetes Care**, v. 40, n. 1, p. 136–154, 2017a.

POP-BUSUI, R. et al. Cardiovascular Autonomic Neuropathy and Cardiovascular Outcomes in the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study. **Diabetes Care**, v. 40, n. 1, p. 94–100, jan. 2017b.

PRODEL, E. et al. **Cardiovascular response to trigeminal nerve stimulation at rest and during exercise in humans: Does sex matter?** *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. [s.l: s.n.].

RAFUSE, P. E. et al. Effects of Valsalva's manoeuvre on intraocular pressure. **Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie**, v. 29, n. 2, p. 73–76, abr. 1994.

RAJENDRA ACHARYA, U. et al. Heart rate variability: a review. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 44, n. 12, p. 1031–1051, 17 dez. 2006.

RAMASAMY, R. et al. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. **Glycobiology**, v. 15, n. 7, p. 16R–28R, 1 jul. 2005.

RATMANOVA, P. et al. Prolonged dry apnoea: effects on brain activity and physiological functions in breath-hold divers and non-divers. **European Journal of Applied Physiology**, v. 116, n. 7, 2016.

REYNEERS, A. K. L. et al. Re-evaluation of the cold face test in humans. **European Journal of Applied Physiology**, v. 82, n. 5–6, p. 487–492, 2000.

ROBERTSON, D. W. et al. **Primer on the Autonomic Nervous System**. [s.l: s.n.].

ROCHA, E. A. et al. Disautonomia: Uma Condição Esquecida – Parte 1. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, n. 4, p. 814–835, 8 abr. 2021.

ROLIM, L. C.; DE SOUZA, J. S. T.; DIB, S. A. Tests for Early Diagnosis of Cardiovascular

- Autonomic Neuropathy: Critical Analysis and Relevance. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, 2013.
- RUDY, A. Diabetic Neuropathy. **New England Journal of Medicine**, v. 233, n. 23, p. 684–689, 6 dez. 1945.
- SACRE, J. W. et al. Diagnostic accuracy of heart-rate recovery after exercise in the assessment of diabetic cardiac autonomic neuropathy. **Diabetic Medicine**, v. 29, n. 9, p. 312–320, 2012a.
- SACRE, J. W. et al. Reliability of heart rate variability in patients with Type 2 diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, v. 29, n. 7, p. e33–e40, jul. 2012b.
- SAHAMBI, J. S.; TANDON, S. N.; BHATT, R. K. P. Using wavelet transforms for ECG characterization. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine**, v. 16, n. 1, p. 77–83, 1997.
- SCHALLER, B. et al. Trigemino-cardiac reflex during surgery in the cerebellopontine angle. **Journal of neurosurgery**, v. 90, n. 2, p. 215–220, fev. 1999.
- SCHALLER, B. et al. The trigemino-cardiac reflex: an update of the current knowledge. **Journal of neurosurgical anesthesiology**, v. 21, n. 3, p. 187–195, jul. 2009.
- SCHLADER, Z. J. et al. Sustained increases in blood pressure elicited by prolonged face cooling in humans. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 311, n. 4, p. R643–R648, 2016.
- SCHLADER, Z. J. et al. Face cooling reveals a relative inability to increase cardiac parasympathetic activation during passive heat stress. **Experimental Physiology**, v. 103, n. 5, p. 701–713, 2018.
- SCHUMER, M. P.; JOYNER, S. A.; PFEIFER, M. A. **Cardiovascular Autonomic Neuropathy Testing in Patients with Diabetes** *Diabetes Spectrum*, 1998.
- SHAFFER, F. et al. The promise of ultra-short-term (UST) heart rate variability measurements: a comparison of Pearson product-moment correlation coefficient and limits of agreement (LoA) concurrent validity criteria. In: MOSS, D.; SHAFER, F. (Eds.). . **Physiological Recording Technology and Applications in Biofeedback and Neurofeedback**. Oakbrook Terrace, IL: Association for Applied Psychophysiology and Biofeedback, 2019. p. 214–220.
- SHAFFER, F.; GINSBERG, J. P. An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms. **Frontiers in Public Health**, v. 5, n. September, p. 1–17, 2017.
- SHAFFER, F.; MEEHAN, Z. M.; ZERR, C. L. A Critical Review of Ultra-Short-Term Heart Rate Variability Norms Research. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 229–233, 19 nov. 2020.
- SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017.

SINGH, D.; VINOD, K.; SAXENA, S. C. Sampling frequency of the RR interval time series for spectral analysis of heart rate variability. **Journal of medical engineering & technology**, v. 28, n. 6, p. 263–272, 2004.

SINGH, G. P. et al. Sudden infant death syndrome - role of trigeminocardiac reflex: A review. **Frontiers in Neurology**, v. 7, n. DEC, p. 1–7, 2016.

SMITH, G. et al. Use of the human dive reflex for the management of supraventricular tachycardia: A review of the literature. **Emergency Medicine Journal**, v. 29, n. 8, p. 611–616, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020**. Científica ed. [s.l.: s.n.].

SOEDAMAH-MUTHU, S. S. et al. Relationship Between Risk Factors and Mortality in Type 1 Diabetic Patients in Europe The EURODIAB Prospective Complications Study (PCS) MASSIMO PORTA, MD 4 JOHN H. FULLER, FRCP 2 FOR THE EURODIAB PROSPECTIVE COMPLICATIONS STUDY GROUP. 2008.

SPALLONE, V. et al. Recommendations for the use of cardiovascular tests in diagnosing diabetic autonomic neuropathy. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. 1, p. 69–78, 2011a.

SPALLONE, V. et al. Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: clinical impact, assessment, diagnosis, and management. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 27, n. 7, p. 639–653, 1 out. 2011b.

SPIRIEV, T. Y.; CHOWDHURY, T.; SCHALLER, B. J. Chapter 2 - The Trigeminal Nerve: Anatomical Pathways. Trigemino-cardiac Reflex Trigger Points. In: CHOWDHURY, T.; SCHALLER, B. J. (Eds.). . **Trigemino-cardiac Reflex**. Boston: Academic Press, 2015. p. 9–35.

SQUIRE, L. et al. **Fundamental Neuroscience**. 3. ed. Burlington: Elsevier, 2008.

STEMPER, B. et al. Evaluation of cold face test bradycardia by means of spectral analysis. **Clinical Autonomic Research**, v. 12, n. 2, p. 78–83, 1 abr. 2002.

SUER, M. Anatomy of the Trigeminal Nerve. In: ABD-ELSAYED, A. (Ed.). . **Trigeminal Nerve Pain: A Guide to Clinical Management**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 5–16.

SUN, L. et al. Dual effect of the Valsalva maneuver on autonomic nervous system activity, intraocular pressure, Schlemm's canal, and iridocorneal angle morphology. **BMC Ophthalmology**, v. 20, n. 1, p. 5, 3 dez. 2020.

TANG, Z.-H. et al. Bayesian estimation of cardiovascular autonomic neuropathy diagnostic test based on short-term heart rate variability without a gold standard. **BMJ Open**, v. 4, n. 10,

p. e005096, 6 out. 2014.

TANK, J. et al. Spontaneous baroreflex sensitivity and heart rate variability are not superior to classic autonomic testing in older patients with type 2 diabetes. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 322, n. 1, p. 24–30, 2001.

TESFAYE, S. et al. Diabetic neuropathies: Update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. **Diabetes Care**, v. 33, n. 10, p. 2285–2293, 2010.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH. The effect of intensive diabetes therapy on measures of autonomic nervous system function in the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). **Diabetologia**, v. 41, n. 4, p. 416–423, 20 mar. 1998.

TROUERBACH, J. et al. Cardiovascular responses elicited by different simulated diving manoeuvres. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 68, n. 4, p. 341–344, 1994.

VAHDATI, G. et al. Chapter 1 - History of the Trigemino-cardiac Reflex: An Odyssey. In: CHOWDHURY, T.; SCHALLER, B. J. (Eds.). . **Trigemino-cardiac Reflex**. Boston: Academic Press, 2015. p. 1–7.

VALENSI, P. et al. Cardiac autonomic neuropathy in diabetic patients: Influence of diabetes duration, obesity, and microangiopathic complications - The French multicenter study. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 52, n. 7, p. 815–820, 2003.

VAN EIJDEN, T. M. G. J.; LANGENBACH, G. E. J. Anatomy of the Trigeminal Nerve. In: BAART, J. A.; BRAND, H. S. (Eds.). . **Local Anaesthesia in Dentistry**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 19–36.

VEGA, J. L. Edmund Goodwyn and the first description of diving bradycardia. **Journal of Applied Physiology**, v. 123, n. 2, p. 275–277, 1 ago. 2017.

VINIK, A. I. et al. Diabetic Autonomic Neuropathy. **Diabetes Care**, v. 26, n. 5, p. 1553–1579, 1 maio 2003.

VINIK, A. I. et al. Cardiac Autonomic Neuropathy in Diabetes: A Predictor of Cardiometabolic Events. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. AUG, 27 ago. 2018.

VINIK, A. I.; ERBAS, T.; CASELLINI, C. M. Diabetic cardiac autonomic neuropathy, inflammation and cardiovascular disease. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 4, n. 1, p. 4–18, 29 jan. 2013.

VINIK, A. I.; ZIEGLER, D. Diabetic Cardiovascular Autonomic Neuropathy. **Circulation**, v. 115, n. 3, p. 387–397, 23 jan. 2007.

WEBSTER, J. G. **Medical Instrumentation: Application and Desig**. 4. ed. Danvers: Wiley, 2009.

WEHLER, D. et al. Reliability of heart-rate-variability features derived from ultra-short ECG recordings and their validity in the assessment of cardiac autonomic neuropathy. **Biomedical**

Signal Processing and Control, v. 68, n. October 2020, p. 102651, 2021.

WELCH, P. The use of fast Fourier transform for the estimation of power spectra: A method based on time averaging over short, modified periodograms. **IEEE Transactions on Audio and Electroacoustics**, v. 15, n. 2, p. 70–73, jun. 1967.

WIDDICOMBE, J.; SANT'AMBROGIO, G. Airway and Pulmonary Afferents and Reflexes: A Historical Survey. In: WEST, J. B. (Ed.). . **Respiratory Physiology: People and Ideas**. New York, NY: Springer New York, 1996. p. 319–351.

WILD, S. et al. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047–1053, 1 maio 2004.

WITTE, D. R. et al. Risk factors for cardiac autonomic neuropathy in type 1 diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 48, n. 1, p. 164–171, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Classification of Diabetes Mellitus 2019**. Geneva: World Health Organization, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Questionário global de atividade física (GPAQ). Abordagem STEPwise da OMS para vigilância de fatores de risco para DCNT. **World Health Organization**, 2017.

YUN, J.-S. et al. Progression of cardiovascular autonomic neuropathy and cardiovascular disease in type 2 diabetes. **Cardiovascular Diabetology**, v. 17, n. 1, p. 109, 2 dez. 2018.

ZIEMSEN, T.; SIEPMANN, T. The investigation of the cardiovascular and sudomotor autonomic nervous system - A review. **Frontiers in Neurology**, v. 10, n. FEB, 2019.

APÊNDICE A – Testes e Critérios para Diagnóstico do Diabetes Mellitus

Como a principal característica do DM é a hiperglicemia, o método utilizado durante décadas e padrão ouro até hoje para diagnóstico da doença é o exame de glicemia laboratorial – análise da concentração de glicose plasmática em uma amostra de sangue (mmol/L ou mg/dl). Os testes recomendados pela WHO, IDF e ADA (ADA, 2020; IDF, 2019; WHO, 2019) são:

- teste de glicemia em jejum (TGJ);
- teste de glicemia 2 horas após teste oral de tolerância à 75 g de glicose (TOTG);
- teste de hemoglobina glicada (HbA1c); e
- Teste de glicemia ao acaso na presença de sintomas de hiperglicemia (TGAH).

Os valores de normalidade para os respectivos exames e os critérios para diagnóstico mais aceitos e adotados pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) são apresentados no Quadro 10. Pessoas com valores acima do limiar crítico são diagnosticadas como portadoras de DM, já pessoas com valores intermediários são diagnosticadas como pré-dispostas ao DM pois possuem níveis glicêmicos oscilantes entre saudáveis e anormais. Este grupo intermediário de indivíduos são comumente denominados pessoas com pré-diabetes ou, mais diretamente, pré-diabéticos, pois apresentam risco maior de desenvolvimento futuro de DM2 (ADA, 2020; IDF, 2019; SBD, 2020; WHO, 2019).

Quadro 10 – Critérios laboratoriais para diagnóstico de normoglicemia, Pré-diabetes e Diabetes Mellitus.

Exame	Normal	Pré-diabetes (Limiar Intermediário)	Diabetes Mellitus (Limiar Crítico)
TGJ (mg/dl)	< 100	≥ 100 e < 126*	≥ 126
TOTG (mg/dl)	< 140	≥ 140 e < 200 †	≥ 200
HbA1c (%)	< 5,7	≥ 5,7 e < 6,5	≥ 6,5
TGAH (mg/dl)	-	-	≥ 200

Fonte: Adaptado de ADA (2020, p. S18) e SBD (2020, p. 24).

TGJ: teste de glicemia em jejum; TOTG: teste de glicemia 2 horas após teste oral de tolerância à 75 g de glicose; HbA1c: teste de hemoglobina glicada; TGAH: teste de glicemia ao acaso na presença de sintomas de hiperglicemia; * conhecida como glicemia de jejum alterada; † conhecida como intolerância oral à glicose.

APÊNDICE B – Formulário de Avaliação Inicial

Instruções:

Este questionário faz parte da pesquisa “Metodologias para Avaliação da Função Autonômica Aplicadas no Diagnóstico, Prevenção e Tratamento do Diabetes Mellitus” cujo Pesquisador Responsável é o Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, Ph.D., vinculado ao Instituto de Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Santa Catarina.

Este questionário só poderá ser respondido pelos voluntários que já assinaram devidamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome completo: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Sexo: () F () M

Telefone: _____ Cidade: _____ Estado: _____

Endereço: _____ Complemento: _____

E-mail: _____

Cor/etnia () Branca () Preta () Parda () Indígena () Amarela

2. AVALIAÇÃO FÍSICA

Estatura (m): _____ Massa (kg): _____ Circ. Abdom (cm): _____

FC (btm/min): _____ PA (mmHg): _____ Temp. Corporal (°C): _____

3. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Hipertensão arterial: () Não () Sim. Obs: _____

Colesterol/triglicerídeos alto: () Não () Sim. Obs: _____

Alguma doença cardiovascular: () Não () Sim. Obs: _____

Algum familiar doença cardiov.: () Não () Sim. Obs: _____

Medicamentos: _____

Diagnóstico de Diabetes: () Não () Sim. Início: _____

Tipo de Diabetes: () DM1 () DM2 Outro: _____

Algum familiar tem Diabetes: () Não () Sim. Parentesco: _____

Exame glicose em jejum*: () Não () Sim. Valor (mg/dL): _____

Teste de tolerância à glicose*: () Não () Sim. Valor (mg/dL): _____

Exame de HbA1c*: () Não () Sim. Valor (%): _____

Medicamentos: _____

* Exame e teste recentes, feitos em até 3 meses.

Possui alguma outra doença: () Não () Sim. Quais: _____

Já fez alguma cirurgia: () Não () Sim. Quais: _____

Já sofreu algum acidente** : () Não () Sim. Quais: _____

Possui alguma deficiência: () Não () Sim. Quais: _____

Medicamentos: _____

** Carro, queda, durante a prática esportiva, lazer ou trabalho.

Média tabaco/dia: () Não () ↓10 cigarros () 10~20 cigarros () ↑20 cigarros

Média álcool/dia: () Não () Pouco () Médio () Muito

Tipo e quantidade de bebida: _____

Se já foi usuário e parou, responder às questões em relação a época que usava. Quando parou: _____

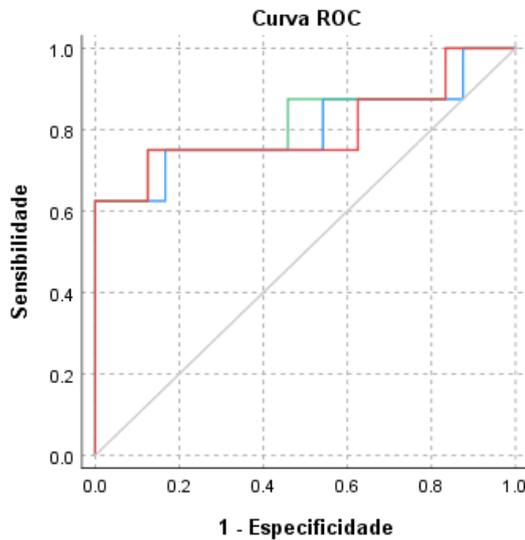
_____, ____ de _____ de _____

Assinatura do voluntário da pesquisa

Assinatura do pesquisador responsável

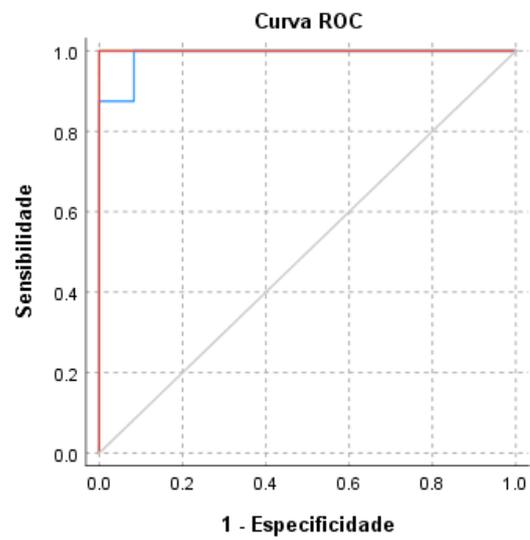
**APÊNDICE C – Análise Individual e Comparativa das Curvas ROC dos Índices
Selecionados da *Ultra-short* HRV no CFT para detecção da CAN**

(a) NNm



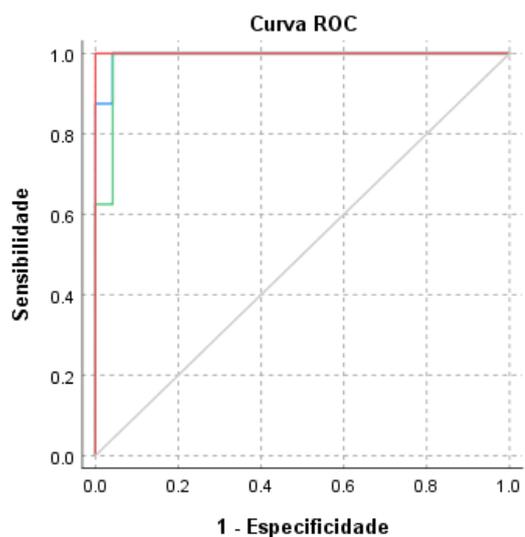
NNm	AUC	valor-p	S (%)	E (%)	p-corte
REP (—):	0,80	= 0,012	62,5	100	≤ 715,8
DR (—):	0,82	= 0,004	62,5	100	≤ 719,6
REC (—):	0,80	= 0,012	62,5	100	≤ 715,7
DR-REP:	= 0,159	(comparação ROC)			
REC-REP:	= 1,000	(comparação ROC)			

(b) SDNN



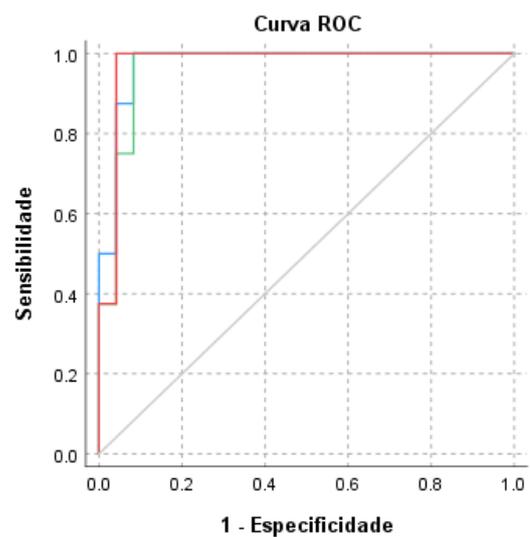
SDNN	AUC	valor-p	S (%)	E (%)	p-corte
REP (—):	0,99	< 0,001	100	91,7	≤ 11,8
DR (—):	1,00	< 0,001	100	100	≤ 11,0
REC (—):	1,00	< 0,001	100	100	≤ 10,6
REP-DR:	= 0,411	(comparação ROC)			
REP-REC:	= 0,411	(comparação ROC)			

(c) RMSSD



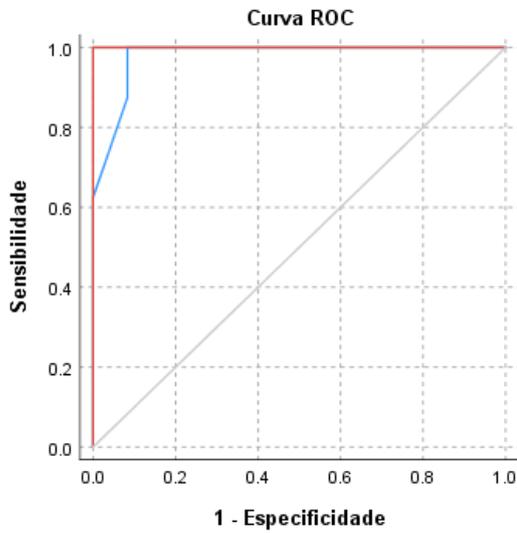
RMSSD	AUC	valor-p	S (%)	E (%)	p-corte
REP (—):	0,99	< 0,001	100	95,8	≤ 10,8
DR (—):	0,98	< 0,001	100	95,8	≤ 11,6
REC (—):	1,00	< 0,001	100	100	≤ 10,7
REP-DR:	= 0,563	(comparação ROC)			
REP-REC:	= 0,480	(comparação ROC)			

(d) TRI idx



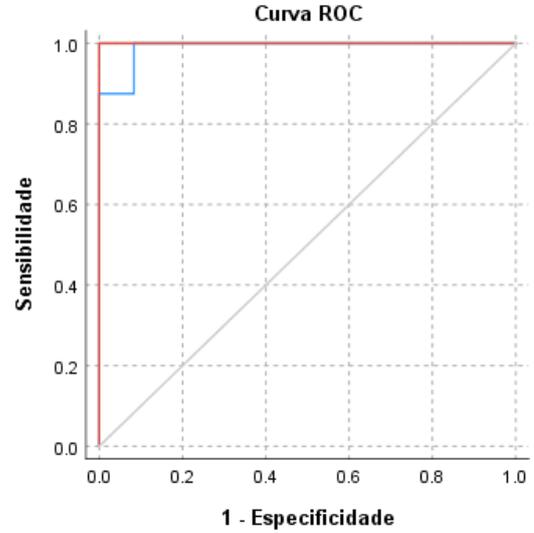
TRI idx	AUC	valor-p	S (%)	E (%)	p-corte
REP (—):	0,97	< 0,001	100	91,7	≤ 4,0
DR (—):	0,96	< 0,001	100	91,7	≤ 3,9
REC (—):	0,97	< 0,001	100	95,8	≤ 3,8
REP-DR:	= 0,749	(comparação ROC)			
REP-REC:	= 1,000	(comparação ROC)			

(e) TINN



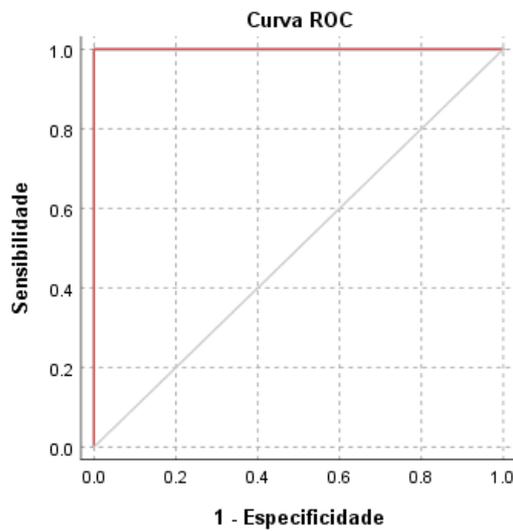
TINN	AUC	valor-p	S (%)	E (%)	p-corte
REP (—):	0,98	< 0,001	100	91,7	≤ 55,5
DR (—):	1,00	< 0,001	100	100	≤ 55,0
REC (—):	1,00	< 0,001	100	100	≤ 64,5
REP-DR:	= 0,273	(comparação ROC)			
REP-REC:	= 0,273	(comparação ROC)			

(f) LF



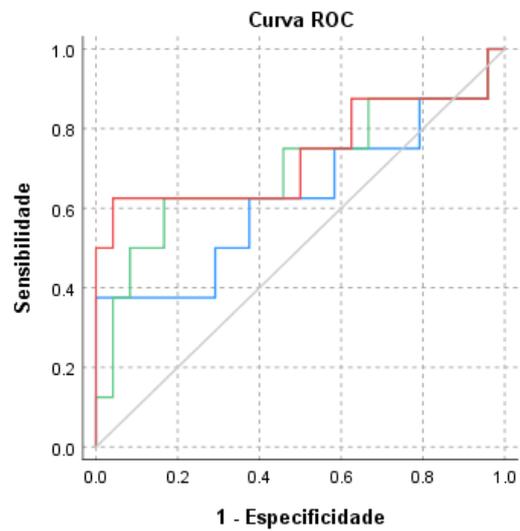
LF	AUC	valor-p	S (%)	E (%)	p-corte
REP (—):	0,91	< 0,001	87,5	83,3	≤ 1,74
DR (—):	0,97	< 0,001	100	87,5	≤ 1,80
REC (—):	0,94	< 0,001	100	83,3	≤ 1,89
REP-DR:	= 0,140	(comparação ROC)			
REP-REC:	= 0,337	(comparação ROC)			

(g) HF



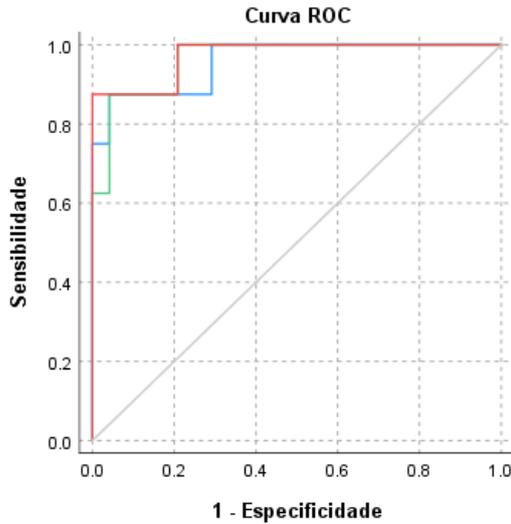
HF	AUC	valor-p	S (%)	E (%)	p-corte
REP (—):	1,00	< 0,001	100	100	≤ 1,43
DR (—):	1,00	< 0,001	100	100	≤ 1,70
REC (—):	1,00	< 0,001	100	100	≤ 1,56
REP-DR:	= 1,000	(comparação ROC)			
REP-REC:	= 1,000	(comparação ROC)			

(h) LF/HF

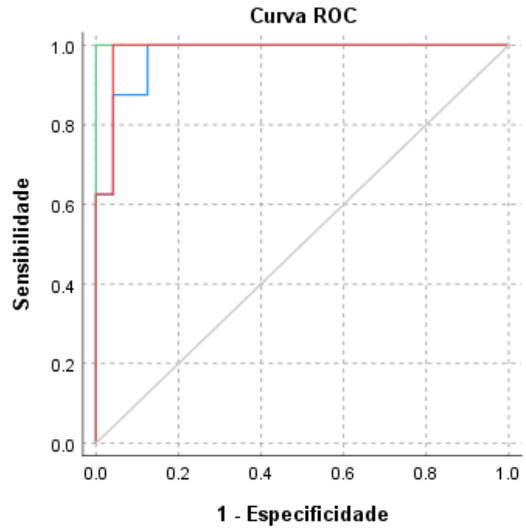


LF/HF	AUC	valor-p	S (%)	E (%)	p-corte
REP (—):	0,63	= 0,368	37,5	100	≥ 0,75
DR (—):	0,70	= 0,133	62,5	91,7	≥ 0,17
REC (—):	0,73	= 0,085	62,5	95,8	≥ 0,43
REP-DR:	= 0,311	(comparação ROC)			
REP-REC:	= 0,077	(comparação ROC)			

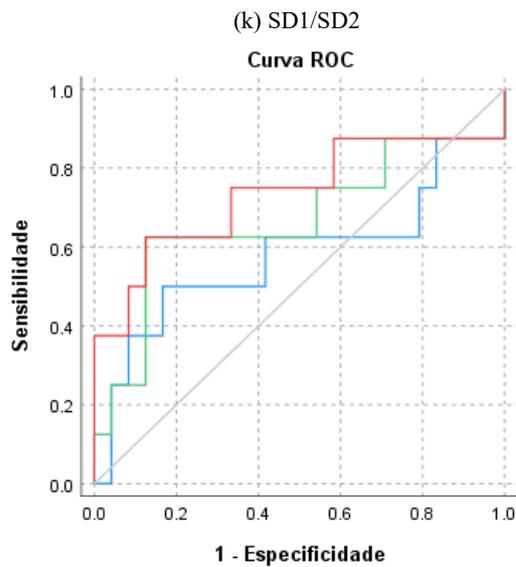
(i) SD1



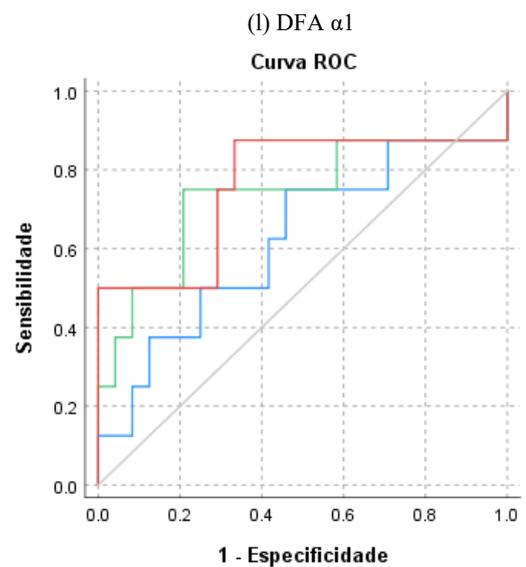
SD1	AUC	valor-p	S (%)	E (%)	p-corte
REP (—):	0,96	< 0,001	87,5	95,8	≤ 7,68
DR (—):	0,96	< 0,001	87,5	95,8	≤ 8,23
REC (—):	0,97	< 0,001	87,5	100	≤ 7,61
REP-DR:	= 0,780	(comparação ROC)			
REP-REC:	= 0,262	(comparação ROC)			



SD2	AUC	valor-p	S (%)	E (%)	p-corte
REP (—):	0,97	< 0,001	100	87,5	≤ 15,1
DR (—):	1,00	< 0,001	100	100	≤ 13,1
REC (—):	0,98	< 0,001	100	95,8	≤ 14,2
REP-DR:	= 0,256	(comparação ROC)			
REP-REC:	= 0,485	(comparação ROC)			



SD1/SD2	AUC	valor-p	S (%)	E (%)	p-corte
REP (—):	0,58	= 0,595	50,0	83,3	≤ 0,47
DR (—):	0,67	= 0,225	62,5	87,5	≤ 0,47
REC (—):	0,73	= 0,075	62,5	87,5	≤ 0,45
REP-DR:	= 0,099	(comparação ROC)			
REP-REC:	= 0,017	(comparação ROC)			



DFA α1	AUC	valor-p	S (%)	E (%)	p-corte
REP (—):	0,62	= 0,360	75,0	54,2	≥ 0,87
DR (—):	0,73	= 0,071	75,0	79,2	≥ 0,95
REC (—):	0,76	= 0,039	87,5	66,7	≥ 1,02
REP-DR:	= 0,041	(comparação ROC)			
REP-REC:	= 0,054	(comparação ROC)			

(j) SD2

Fonte: Elaborado pelo Autor.

ROC: receiver operating characteristic; CFT: cold face test; REP: repouso; DR: diving reflex; REC: recuperação; AUC: area under the curve; S: sensibilidade; E: especificidade; NNm: intervalo NN médio; SDNN: standard deviation of all NN intervals; RMSSD: square root of the mean of the sum of the squares of differences between adjacent NN intervals; TRI idx: HRV triangular index; TINN: triangular interpolation of successive NN intervals; LF: low frequency; HF: high frequency; SD: Poincaré plot standard deviation; DFA: detrended fluctuation analysis; valor-p: valor de probabilidade; p-corte: ponto de corte

ANEXO A – Parecer Consubstanciado CAAE 43349021.1.0000.0121 da CEPESH/UFSC

<https://drive.google.com/file/d/1DBZbsHHBIdxCoVvmhb7-weQLyrPzCl1i/view?usp=sharing>

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

<https://drive.google.com/file/d/1NOte0Zxdd5pdi3BU6fxsf3uAVvdvKhQw/view?usp=sharing>

ANEXO C – Global Physical Activity Questionnaire (GPAQ)

<https://drive.google.com/file/d/1J43pFi8njV-AI43BuYfdLQx0brBUZqb1/view?usp=sharing>

ANEXO D – POP Testes de Referência

<https://drive.google.com/file/d/1uE4oN2BfgctVx8TTbqzBcpUBT987HnBv/view?usp=sharing>

ANEXO E – POP DR-CFT

<https://drive.google.com/file/d/134WDkClbM60aBtXQp2e3w3JmXp5iP0eX/view?usp=sharing>