Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Departamento de Fisiologia

Análise da função barorreflexa e parâmetros cardiovasculares avaliados pela cateterização de diferentes artérias em ratos não anestesiados
Murilo Augusto Duarte Vieira

Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Departamento de Fisiologia

VERSÃO CORRIGIDA

Análise da função barorreflexa e parâmetros cardiovasculares avaliados

pela cateterização de diferentes artérias em ratos não anestesiados

Murilo Augusto Duarte Vieira

Dissertação apresentada ao Programa de

Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade

de Medicina de Ribeirão Preto,

Universidade de São Paulo, como parte dos

requisitos para obtenção do título de Mestre

em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Rubens Fazan Jr.

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Penteado Martins Dias

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Vieira, Murilo Augusto Duarte

Análise da função barorreflexa e parâmetros cardiovasculares avaliados pela cateterização de diferentes artérias em ratos não anestesiados. Ribeirão Preto, 2021.

69 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Fazan Jr., Rubens.

Coorientador: Dias, Daniel Penteado Martins

1. Isquemia. 2. Variabilidade da frequência cardíaca. 3. Sistema nervoso autônomo. 4. Barorreflexo.

Folha de Aprovação

Nome: Murilo Augusto Duarte Vieira

Título: Análise da função barorreflexa e parâmetros cardiovasculares avaliados pela cateterização de diferentes artérias em ratos não anestesiados.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Aprovado	em:		/ ,	/
		$\overline{}$	$\overline{}$	$\overline{}$

Banca Examinadora

_Assinatura:
_Assinatura:
_
_Assinatura:
_Assinatura:
_Assinatura:

Dedicatória

À minha mãe, Maria Angélica Duarte e ao meu pai, Pedro Rogério Vieira com amor e minha eterna gratidão.



O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

VIEIRA, M. A. D. Análise da função barorreflexa e parâmetros cardiovasculares avaliados pela cateterização de diferentes artérias em ratos não anestesiados. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Resumo

A medida direta da pressão arterial (PA) pela cateterização oclusiva de artérias periféricas é um procedimento comum em laboratórios de fisiologia cardiovascular. No entanto, fatores como isquemia, inflamação e/ou dor podem comprometer a interpretação de dados coletados, principalmente em animais não anestesiados. No presente estudo, avaliamos parâmetros hemodinâmicos, variabilidade da frequência cardíaca, da pressão arterial e função barorreflexa em ratos com cateterização de diferentes artérias. Foram selecionados registros basais de PA de estudos prévios do laboratório realizados por meio de cateteres implantados na a. femoral (N=10), carótida (N=9) ou por cateterização não oclusiva da aorta abdominal (N=13). Séries de valores de intervalo de pulso (IP) e PA sistólica foram geradas para cada grupo de registros e utilizadas para cálculo de índices de variabilidade desses parâmetros, bem como para avaliação da função barorreflexa pela técnica da sequência e por análise espectral cruzada. Os ratos com cateter na carótida foram taquicardíacos (392±18 bpm) comparados àqueles com cateter na a. femoral (358±11 bpm) ou aorta abdominal (343±10 bpm). A PA sistólica foi maior nos animais com cateter na a. femoral (126±3 mmHg) em relação aos outros grupos (123±3 mmHg, carótida; 113±3 mmHg, aorta abdominal). A variabilidade do IP nos domínios do tempo e frequência, bem como a entropia amostral, foram semelhantes entre os grupos, no entanto, o espectro da PA mostrou um aumento na potência das oscilações de baixa frequência nos animais com cateter na a. femoral (6,9±1,1 mmHg²) em relação aos demais grupos (3,2±0,5 e 2,9±0,5 mmHg²). A análise simbólica dos valores de PA mostrou aumento na incidência dos padrões de 1V (45±2 %) em comparação com os animais cateterizados na aorta (36±2 %). Os animais com cateter na a. femoral apresentaram menor sensibilidade do barorreflexo (0,9±0,06 ms/mmHg) do que aqueles cateterizados através da aorta abdominal (1,3±0,06 ms/mmHg). A análise espectral cruzada mostrou resultados semelhantes à técnica da sequência para avaliação do barorreflexo. Dessa forma, podemos sugerir que a cateterização oclusiva, tanto da a. femoral, como da carótida levam a um desbalanço autonômico com preponderância simpática e a uma disfunção o barorreflexo. Então, é importante considerar o potencial o potencial efeito oclusão arterial na interpretação de dados.

Palavras chave: isquemia; variabilidade da frequência cardíaca; sistema nervoso autônomo; barorreflexo.

VIEIRA, M. A. D. Analysis of baroreflex function and heart rate variability measured trough the catheterization of different arteries on unanesthetized rats. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Abstract

Direct measurement of arterial pressure (AP) by occlusive catheterization of peripheral arteries is a common procedure in cardiovascular physiology laboratories. However, factors such as ischemia, inflammation and/or pain can affect the interpretation of collected data, especially in unanesthetized animals. In the present study, we evaluated hemodynamics, heart rate and blood pressure variability, as well as baroreflex function in rats with catheterization of different arteries. Baseline AP recordings from previous studies performed in our laboratory through catheters in femoral artery (N=10), carotid (N=9) or by non-occlusive catheterization of the abdominal aorta (N=13). Series of pulse interval (PI) and systolic AP values were generated for each group of recordings and used to calculate the variability indices of these parameters, as well as to assess the baroreflex function by the sequence technique and by cross-spectral analysis. Rats with catheter in the carotid were tachycardiac (392±18 bpm) compared to those with catheter in femoral artery (358±11 bpm) or abdominal aorta (343±10 bpm). Systolic AP was higher in animals with a catheter into femoral artery (126±3 mmHg) as compared to the other groups (123±3 mmHg, carotid; 113±3 mmHg, abdominal aorta). The variability of PI in the time and frequency domains, as well as the sample entropy, were similar among the groups, however, the AP spectra showed an increased power of low frequency oscillations in animals with catheter into femoral artery (6.9±1.1 mmHg²) as compared to the other groups (3.2±0.5 and 2.9±0.5 mmHg²). Symbolic analysis of BP values showed an increase in the incidence of 1V patterns (45±2 %) compared to animals catheterized in the aorta (36±2 %). Animals with catheters into femoral artery had lower baroreflex sensitivity (0.9±0.06 ms/mmHg) than those catheterized through the abdominal aorta (1.3±0.06 ms/mmHg). Cross spectral analysis showed similar results than the sequence technique. Our study suggests that occlusive catheterization of femoral artery, as well as carotid, lead to an autonomic unbalance (with sympathetic predominance) and baroreflex dysfunction in awake rats. Therefore, it is important to consider the potential effect of arterial occlusion in data interpretation.

Keywords: ischemia; heart rate variability; autonomic nervous system; baroreflex.

Lista de Abreviaturas

AC Adenilato ciclase

ACh Acetilcolina

AMPc Monofosfato cíclico de adenosina

ATP Trifosfato de adenosina

BEI Índice de efetividade do barorreflexo

CVLM Medula ventrolateral caudal

DDL Despolarização diastólica lenta

ECG Eletrocardiograma

EPM Erro padrão da média

FC Frequência cardíaca

FFT Transformada rápida de Fourier

HF Banda de alta frequência

HP Filtro passa alta

HRV Variabilidade da frequência cardíaca

Ik Corrente de potássio

IP Intervalo de pulso

LF Banda de baixa frequência

LP Filtro passa baixa

NAV Nó atrioventricular

Nor Norepinefrina

NSA Nó sinoatrial

PAP

PA Pressão arterial

PAS Pressão arterial sistólica

PKA Proteína quinase dependente de AMPc

Pressão arterial pulsátil

SampEn Entropia amostral

SBR Sensibilidade barorreflexa

SD Desvio padrão

SDNN Desvio padrão de valores normais do intervalo de pulso

SNA Sistema nervoso autônomo

Lista de Figuras

Figura 1 - Ilustração da técnica cirúrgica de cateterização não oclusiva da artéria aorta abdominal
Figura 2 - (A) Ilustração de um corte sagital do coração, evidenciando o sistema gerador e condutor de potencias de ação. (B) Registro de eletrocardiograma (ECG) do potencial elétrico cardíaco e o intervalo entre dois batimentos (intervalo RR) 17
Figura 3 - Processo de geração de séries temporais de intervalo de pulso a partir dos picos de pressão arterial19
Figura 4 - Captura de tela da janela de correção de artefato no programa computacional PyBioS
Figura 5 - (A) Ilustração da simbolização de uma série temporal em uma série de valores e (B) exemplos dos diferentes padrões de símbolos utilizados na dinâmica simbólica: nenhuma variação (0V), uma variação (1V), 2 variações em sentidos opostos (2UV) e 2 variações no mesmo sentido (2LV)
Figura 6 - Tela do programa CardioSeries, mostrando a aba de visualização de sequências barorreflexas e não barorreflexas
Figura 7 - Exemplos de séries originais e filtradas de pressão arterial sistólica e intervalo de pulso respectivamente (A-B), séries com filtragem passa baixa (LP, C-D) e passa alta (HP, E-F)
Figura 8 - Traçados representativos do sinal de registro da pressão arterial pulsáti (PAP) em ratos submetidos a cateterização da femoral, carótida e aorta abdomina por técnica não oclusiva
Figura 9 - Valores basais da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial sistólica (PAS) de ratos submetidos ao registro de PA através da cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral
Figura 10 - Valores do desvio padrão das séries de IP (SDNN) e da raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre valores sucessivos (RMSSD), em ratos submetidos ao registro de PA através da cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral

Figura 11 – Valores do desvio padrão (SD) dos valores de PA, representando a variabilidade desse parâmetro no domínio do tempo, de ratos submetidos ao registro de PA através da cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral
Figura 12 - Valores da potência do espectro de IP nas bandas de baixa- (LF) e alta-frequência (HF), em unidades normalizadas (nu) e absolutas (ms²), respectivamente, de ratos com cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral
Figura 13 - Valores da potência do espectro de PA sistólica, na banda de baixa-frequência (LF), de ratos com cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral
Figura 14 - Resultados da análise simbólica das séries de IP, mostrando a porcentagem de sequências de símbolos com variação do tipo 1V e 2UV de ratos com cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral.
Figura 15 - Resultados da análise simbólica das séries de PA, mostrando a porcentagem de sequências de símbolos com variação do tipo 1V em ratos com cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral
Figura 16 - Valores de entropia amostral de ratos submetidos ao registro da PA através da cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral
Figura 17 - Valores do da sensibilidade do barorreflexo espontâneo (SBR) e do índice de efetividade do barorreflexo (BEI) avaliados pelo do método da sequência em séries de PA e IP de ratos com cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral
Figura 18 - Valores da sensibilidade do barorreflexo espontâneo (SBR), avaliada pelo método da sequência, em séries de PA e IP submetidas a filtragem passa baixa ou passa alta
Figura 19 - Valores da sensibilidade barorreflexa (SBR) nas bandas de baixa- (LF) ou alta-frequência (HF) avaliada através da função de transferência entre espectros da IP e PA (análise espectral cruzada)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Controle autonômico do sistema cardiovascular	16
1.2 Variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial	18
1.3 Função barorreflexa	21
2 HIPÓTESE E OBJETIVOS	23
3 MÉTODOS	25
3.1 Animais	26
3.2 Procedimentos cirúrgicos	26
3.3 Processamento dos dados	26
3.3.1 Variabilidade total do intervalo de pulso e da PA sistólica	27
3.3.2 Análise espectral da variabilidade do intervalo de pulso e da PA sistólica	ı28
3.3.3 Dinâmica simbólica do intervalo de pulso e da PA sistólica	28
3.3.4 Entropia amostral do intervalo de pulso e da PA sistólica	29
3.4 Análise do barorreflexo espontâneo	30
3.4.1 Domínio do tempo (método da sequência)	30
3.4.1.1 Com séries originais	30
3.4.1.2 Com séries filtradas	31
3.4.2 Sensibilidade barorreflexa avaliada no domínio da frequência	33
3.5 Análise estatística	33
RESULTADOS	34
4.1 Valores hemodinâmicos basais	35
4.2 Variabilidade total do intervalo de pulso e da PA sistólica	37
4.3 Análise espectral do intervalo de pulso e da PA sistólica	40
4.4 Análise simbólica do intervalo de pulso e da PA sistólica	43
4.5 Entropia do intervalo de pulso	46
4.6 Função barorreflexa avaliada pelo método da sequência	47
4.6.1 Em séries originais	47
4.6.2 Em séries filtradas	49
4.7 Sensibilidade do barorreflexo avaliada no domínio da frequência	51
4.8 Correlação entre os diferentes métodos de análise de SBR	53
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	63

A medida direta da pressão arterial (PA) em ratos, tanto anestesiados como não anestesiados, talvez seja o procedimento mais comumente utilizado em estudos que envolvem o sistema cardiovascular. Portanto, a cateterização de artérias em animais de experimentação, com consequente obstrução do fluxo sanguíneo destas, é um procedimento extremamente frequente. Entretanto, a isquemia tecidual e a resposta inflamatória envolvida nesses procedimentos, tem potencial para interferir sobremaneira nas respostas observadas nesses estudos.

As artérias mais utilizadas para medida direta da PA em ratos são a artéria femoral e a carótida. A isquemia tecidual provocada pela obstrução dessas artérias pode influenciar, de modo distinto, a fisiologia "normal" do sistema cardiovascular. A isquemia de uma grande massa de tecido muscular esquelético (pata posterior) decorrente da obstrução da artéria femoral leva a mudanças teciduais locais, com acúmulo de fatores que podem atuar sistemicamente sobre a função cardíaca e vascular. Ademais, a resposta inflamatória que acontece no tecido isquêmico também pode afetar diversos aspectos da fisiologia cardiovascular.

A interação mútua entre o sistema imune e o sistema nervoso autônomo (SNA) é algo bem estabelecido na literatura e têm sido alvo de interesse da comunidade científica. O sistema imunológico é capaz de modular a atividade autonômica tanto em condições fisiológicas como patológicas. Desse modo, a inflamação pode ser um possível mediador de alterações no balanço autonômico, justificando que as repercussões cardiovasculares da cateterização da artéria femoral sejam avaliadas de forma pormenorizada (MARTELLI; FARMER; YAO, 2016; SANTOS-ALMEIDA *et* al., 2017). De fato, estudos distintos sugerem que o aumento dos níveis circulantes de mediadores pró-inflamatórios está intimamente relacionado com o aumento da atividade simpática (HELWIG *et al.*, 2008; NIIJIMA *et al.*, 1991), com a diminuição da sensibilidade barorreflexa (TAKAGISHI et al., 2010) e com a redução da variabilidade da frequência cardíaca (HRV) (FAIRCHILD et al., 2009). Por fim, é importante destacar que, em experimentos realizados em animais não anestesiados, fenômenos algésicos decorrentes da isquemia/inflamação da pata do animal podem também afetar o balanço autonômico do organismo, afetando parâmetros cardiovasculares coletados nesses animais (OLIVEIRA et al., 2012).

No caso específico da carótida, anastomoses bastantes eficientes na circulação cerebral protegem o tecido nervoso central da isquemia decorrente da obstrução dessa artéria que tem papel importante na irrigação sanguínea do encéfalo (NICOLAU

et al., 2001; POLYCARPOU et al., 2016). Entretanto, a cateterização de uma artéria carótida comum certamente acarreta um certo grau de isquemia central, o que também pode afetar sobremaneira a modulação neural do coração e dos vasos sanguíneos. Além disso, a desativação dos barorreceptores localizados no seio carotídeo, decorrente da obstrução do fluxo sanguíneo, também pode comprometer a função barorreflexa arterial, afetando a modulação autonômica cardiovascular.

Em meados da década de 1960, um método de cateterização crônica da aorta abdominal foi desenvolvido por James Weeks e Julie Jones (WEEKS; JONES, 1960). Nesse método tubos de polietileno, são implantados permanentemente na aorta sem que haja a obstrução do fluxo sanguíneo arterial, permitindo medidas rotineiras diretas da PA em ratos não anestesiados por longos períodos (semanas ou meses). No entanto, além de permitir o registro direto da PA por várias semanas, essa cateterização crônica não-oclusiva da aorta abdominal evita, ou minimiza de maneira importante, os efeitos deletérios da isquemia tecidual que ocorre com a cateterização oclusiva de artérias periféricas. Então, apesar de ser uma metodologia que requer um procedimento cirúrgico mais complexo, após o período de recuperação adequado, os ratos têm condições de "saúde" superiores àquelas apresentadas por animais com cateterização tanto da artéria femoral, como da carótida comum (LESTAGE *et al.*, 1985; WEEKS; JONES, 1960).

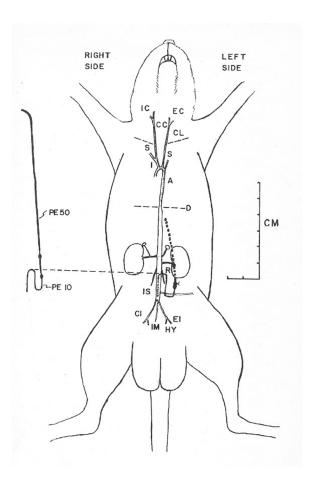


Figura 1 - Ilustração da técnica cirúrgica de cateterização não oclusiva da artéria aorta abdominal (Adaptado de Bengis,1978).

1.1 Controle autonômico do sistema cardiovascular

O miocárdio exerce sua ação como bomba devido a ativação espontânea de células especializadas que exibem certa ritmicidade. As células do nó sinoatrial (NSA), nó atrioventricular (NAV), e o sistema de His-Purkinje são células auto excitáveis capazes de iniciar espontaneamente potenciais de ação sem qualquer estimulo neural ou hormonal (GORDAN *et al.*, 2015).

As células do NSA estão situadas em torno da desembocadura da cava superior no átrio direito sendo responsáveis pela gênese da atividade elétrica cardíaca, atuando como marcapasso do coração. A quantidade de batimentos cardíacos por minuto (FC) é dada pela frequência de disparo espontânea das células do NSA. Desse modo, o estímulo elétrico que parte do NSA se propaga através dos átrios, promovendo a sístole atrial e alcança os ventrículos através do NAV e sistema de His-Purkinje, levando à sístole ventricular (SHAFFER *et al.*, 2014).

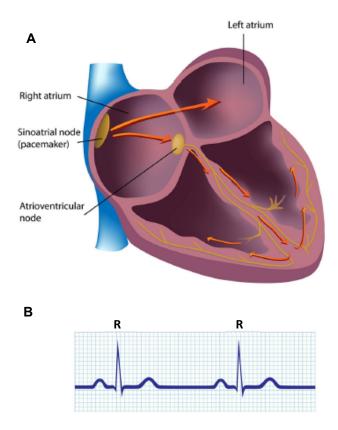


Figura 2 - (A) Ilustração de um corte sagital do coração, evidenciando o sistema gerador e condutor de potencias de ação. (B) Registro de eletrocardiograma (ECG) do potencial elétrico cardíaco e o intervalo entre dois batimentos (intervalo RR) (Adaptado de Shaffer et al. (2014).

Apesar da propriedade intrínseca do coração em gerar potenciais de ação para ativar suas células, é através do SNA que ocorre o principal mecanismo de regulação da atividade cardíaca. De acordo com diferenças anatômicas e funcionas próprias, o SNA é dividido em divisão simpática e parassimpática, responsáveis por modular a descarga espontânea das células marcapasso. Dessa forma, a ritmicidade existente nas células marcapasso, passa a apresentar irregularidades temporais entre os batimentos, os quais refletem a flutuação causada pela modulação autonômica cardíaca. Em condições fisiológicas essa regulação existe com a finalidade de adaptar o trabalho cardíaco, de maneira rápida, às necessidades metabólicas do organismo (SHAFFER et al., 2014).

No coração, o simpático modula a atividade cardiovascular principalmente através do neurotransmissor norepinefrina (Nor), que se liga a receptores β1-

adrenérgicos acoplados a proteína G estimulatória, presentes no NSA, NAV, átrios e ventrículos. Essa ligação promove a ativação da enzima adenilato ciclase (AC), responsável por converter trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). O AMPc tem a função de ativar a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), a qual fosforila proteínas específicas de canais iônicos. Desse modo, a influência da Nor no cronotropismo se dá por meio do aumento da taxa de disparos do NSA através do aumento do influxo de íons de sódio e cálcio, reduzindo a velocidade da despolarização diastólica lenta (DDL) dos cardiomiócitos. Na fase de repolarização, tanto no NSA quanto no NAV a Nor promove aumento da corrente de potássio (Ik) com consequente redução do período refratário relativo. No entanto, além de efeitos no cronotropismo, a Nor provoca também o aumento da força de contração (inotropismo positivo) através da fosforilação da proteína troponina C e a estimulação de enzimas que participam na recaptação do cálcio sarcoplasmático (SERCA) (GORDAN et al., 2015; SHAFFER et al., 2014).

O parassimpático tem sua ação efetora através da Acetilcolina (ACh). A ACh, ao contrário da Nor, atua no NSA de modo a reduzir a frequência de potenciais de ação através da diminuição da velocidade da DDL, ou seja, causa um efeito cronotrópico negativo. Além disso, a ACh retarda a velocidade de condução do impulso elétrico pelo NAV e reduz a força de contração (inotropismo negativo), principalmente nos átrios onde a densidade de terminais vagais é maior que nos ventrículos. A ação desse neurotransmissor se dá através de sua ligação com receptores muscarínicos do tipo 2 acoplados à proteína G inibitória, a qual inibe a AC e reduz os níveis de AMPc circulantes com consequente menor atividade da PKA e redução na fosforilação de canais iônicos. Desse modo, o parassimpático estabelece uma resposta antagônica ao estímulo simpático, favorecendo aumento da corrente potássio e redução da corrente de marca-passo (GORDAN et al., 2015; SHAFFER et al., 2014).

1.2 Variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial

Há consenso, apoiado pela extensa literatura publicada nas últimas décadas, de que as oscilações espontâneas da frequência cardíaca, conhecidas como variabilidade da frequência cardíaca (HRV), contêm informações valiosas, não apenas sobre o coração, mas, também, sobre a homeostase do organismo como um todo (APPELHANS; LUECKEN, 2006; MALLIANI; MONTANO; PAGANI, 1997; TOBALDINI

et al., 2013). Tem sido amplamente demonstrado que índices derivados de séries temporais de frequência cardíaca e também de registros de PA, batimento a batimento, provêm sólidas informações sobre o estado do organismo, e são importantes preditores de risco para doenças cardíacas (CHATTIPAKORN et al., 2007; FRANÇA DA SILVA et al., 2016; SINGH et al., 1998). Os componentes oscilatórios da HRV são, primariamente, associados à modulação autonômica (parassimpática e simpática) do coração. No entanto, influências não autonômicas, como as propriedades das células de marca-passo cardíacas e fatores humorais, foram reconhecidas, mais recentemente, como sendo de grande importância para a gênese da HRV (MALLIANI, 1999; MALLIANI; MONTANO; PAGANI, 1997).

Geralmente, as séries temporais utilizadas nas análises de HRV são geradas a partir do eletrocardiograma (ECG) ou do registro direto da PA, no qual são detectados os picos das ondas R ou pontos de inflexão da PA pulsátil e calculadas as durações dos intervalos cardíacos (ou de pulso) sucessivos. A figura 3 ilustra o processo de geração das séries temporais de intervalo cardíaco (ou de pulso) utilizadas para as análises de HRV.

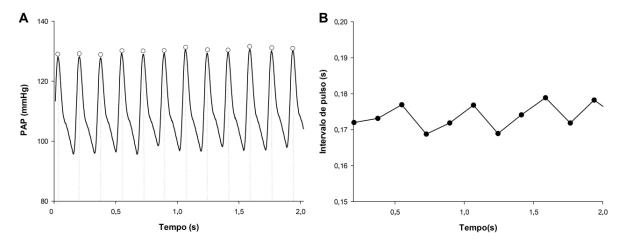


Figura 3 – Processo de geração de séries temporais de intervalo de pulso a partir dos picos de pressão arterial. (A) Pressão arterial pulsátil; (B) Intervalo de pulso.

A análise da HRV pode ser realizada a partir de métodos lineares, e nãolineares. Entre os métodos lineares, destacamos aqueles que avaliam as características estatísticas de séries de valores de intervalo de pulso (IP) e, portanto, medem a variabilidade total da FC. Esses são chamados de métodos no domínio do tempo e guardam estreita relação com a modulação autonômica do coração (TASK

FORCE, 1996; MALLIANI *et al.*, 1991). Os índices da HRV no domínio do tempo são valiosas ferramentas para o diagnóstico de disautonomias e têm valor preditivo para estratificação de risco cardíaco.

A HRV também pode ser estudada no chamado domínio da frequência, cujo método de análise mais comum é a análise espectral. Essa análise avalia as oscilações rítmicas presentes nas séries de valores de IP em diferentes faixas de frequências. Tais ritmos guardam estreita correlação com a modulação autonômica sobre o sistema cardiovascular, de modo que ritmos de baixa frequência (LF) estão comumente associados a modulação simpática e ao barorreflexo, enquanto ritmos de alta frequência (HF), relacionados à respiração, associam-se à modulação parassimpática. Portanto, o uso da análise espectral é uma importante ferramenta para avaliação e monitoração do balanço simpato-vagal cardíaco, tanto no nível clínico como experimental (AKSELROD *et al.*, 1981; LOMBARDI; STEIN, 2011; MALLIANI; MONTANO; PAGANI, 1997).

Mais recentemente, a HRV têm sido avaliada através de métodos que extraem características não-lineares das séries de IP e/ou PA. Entre os métodos clássicos para estudo das dinâmicas não-lineares da variabilidade de parâmetros cardiovasculares (principalmente a frequência cardíaca) estão a entropia e a análise simbólica. A entropia é uma medida de imprevisibilidade de séries temporais. Um sinal previsível possui menor entropia e pouca informação sendo produzida, enquanto um sinal imprevisível possui maior entropia e maior produção de informação ao longo do tempo. Já a dinâmica simbólica consiste na transformação das séries temporais de intervalo cardíaco em símbolos e vários métodos têm sido descritos com esse propósito. Dentre esses, a análise simbólica mais comumente utilizada é a proposta por Porta e colaboradores (PORTA et al., 2001), que tem como objetivo avaliar a regulação autonômica cardíaca. Esse método traz como interpretação fisiológica clássica, que a incidência de padrões de símbolos com pouca/nenhuma variação, conhecidos como 0V, estão relacionados com a atividade simpática cardíaca, enquanto padrões simbólicos maior variação (2V) associam-se à modulação vagal do coração. Dessa forma, a dinâmica de distribuição dos símbolos é estudada, trazendo importantes informações sobre diversas características da HRV. Entretanto, outras estratégias de simbolização de valores também são maneiras promissoras de extrair informações sobre a "saúde" cardiovascular.

1.3 Função barorreflexa

É notório, que a manutenção dos níveis de PA numa estreita faixa de variação é essencial para permitir a perfusão sanguínea apropriada nos diferentes tecidos e a homeostase cardiocirculatória. Para isso, a PA é regulada por mecanismos interrelacionados que atuam a curto e longo prazo. A regulação a curto prazo ocorre momento a momento e promove ajustes rápidos (segundos ou minutos) e precisos da PA. Esse controle ocorre principalmente por mecanorreceptores, localizados no arco aórtico e nos seios carotídeos, conhecidos como barorreceptores arteriais. O estiramento dos barorreceptores promove uma inibição reflexa da atividade simpática, e uma potente estimulação da atividade eferente vagal (parassimpática) ao coração.

Desse modo, a integridade e o funcionamento conjunto dos componentes do barorreflexo são essenciais para os ajustes rápidos e precisos da PA. De todo modo, as oscilações espontâneas do IP e PA, podem fornecer informações não só da variabilidade cardíaca, mas também sobre função barorreflexa, conhecido como barorreflexo espontâneo (DI RIENZO et al., 1985). Disfunções desse reflexo são observadas em diversas condições clínicas, tais como Infarto do miocárdio (KLEIGER et al., 1987), insuficiência cardíaca (OSTERZIEL et al., 1995), diabetes mellitus (ROWAIYE; JANKOWSKA; PONIKOWSKA, 2013), hipertensão arterial (BRISTOW et al., 1969), fibromialgia (OLIVEIRA et al., 2012), entre outras, contribuindo para o agravamento dessas condições e levando a um risco aumentado de eventos cardiovasculares graves e até mesmo morte súbita.

Considerando a natureza simpato-inibidora do barorreflexo arterial, déficiências deste reflexo são comumente associadas a condições de hiperatividade simpática. Diversas evidências mostram de que a mensuração da sensibilidade do barorreflexo (SBR) é um parâmetro valioso na avaliação do risco de eventos cardiovasculares (GOLDBERGER *et al.*, 2008; KLINGENHEBEN; HOHNLOSER, 2003). Além disso, a SBR pode ser avaliada tanto no domínio do tempo (método da sequência), quanto no domínio da frequência por meio da análise espectral cruzada (função de transferência) (LINDEN; DIEHL, 1996; DI RIENZO *et al.*, 1985).

O método de sequência, foi descrito em meados da década de 1980 por Di Rienzo *et al.* (1985), e foi um marco para a análise da função barorreflexa. Primeiro, porque utiliza as flutuações espontâneas da PA e do IP, ou seja, esta abordagem não requer manobras farmacológicas que induzem mudanças na PA, evitando muitas

desvantagens relacionadas a elas. Também, porque o método de sequência não avalia apenas a SBR, mas também fornece um índice de efetividade do barorreflexo (BEI). Em contraste com a SBR, o BEI reflete a porcentagem de mudanças na PA batimento a batimento que são efetivamente traduzidos em alterações reflexas da frequência cardíaca (DI RIENZO *et al.*, 2001). Dessa forma, o BEI é considerado um índice complementar à SBR, proporcionando ao método da sequência, informações sobre a função barorreflexa como um todo.

A SBR pode ser avaliada também, por meio de métodos no domínio da frequência, como por exemplo a análise espectral cruzada. Em síntese, esse método utiliza séries temporais com valores de PA e IP, para cálculo de um espectro e posterior determinação no ganho barorreflexo (SBR). A linearidade entre as séries é reconhecida, avaliada e calculada pelas funções de coerência e transferência, de modo que série de entrada é representada pela pressão arterial sistólica (PAS) e a série de saída é retratada pelos valores de IP.

Dessa forma, com base nos argumentos expostos, hipotetizamos que as diversas repercussões da oclusão de artérias periféricas (a. femoral e carótida) sobre o organismo podem levar a alterações do controle cardiovascular com potencial para comprometer sobremaneira dados coletados em estudos de fisiologia/fisiopatologia do sistema cardiovascular em modelos animais.

Hipótese e objetivos 24

Hipótese: A cateterização oclusiva de artérias periféricas, como a. femoral ou carótida, em animais de experimentação (ratos) pode levar a alterações, decorrentes da isquemia tecidual e/ou da desativação de barorreceptores arteriais, com consequências na qualidade de dados, especialmente quando coletados na ausência de anestesia.

Objetivo geral: Avaliar possíveis diferenças em parâmetros hemodinâmicos, função barorreflexa e modulação autonômica cardiovascular (por meio da variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial), em ratos com **cateteres oclusivos** na a. femoral ou carótida ou com **cateterização não-oclusiva** da aorta abdominal.

Objetivos específicos

Avaliar em registros de pressão arterial realizados em ratos não anestesiados com cateteres oclusivos unilaterais na a. femoral ou carótida ou com cateterização não-oclusiva da aorta abdominal:

- 1. Frequência cardíaca (FC), pressão arterial (PA) basal;
- 2. Parâmetros de variabilidade de valores de intervalo de pulso (IP) e PA sistólica. Tais parâmetros serão calculados no domínio do tempo (variabilidade total métodos estatísticos), no domínio da frequência (análise espectral) e por métodos que avaliam dinâmicas não lineares desses valores (análise simbólica e entropia amostral);
- Analisar a sensibilidade e a efetividade do barorreflexo arterial espontâneo no domínio do tempo (método da sequência) e da frequência (função de transferência da análise espectral cruzada).

3.1 Animais

Para o presente trabalho foram resgatados registros de PA de outros estudos desenvolvidos no laboratório de Fisiologia Cardiovascular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Todos os registros foram conduzidos em ratos não anestesiados, realizados na mesma época do ano (2014), em ratos adultos jovens (250-300 g) da linhagem Wistar, oriundos do Biotério Central da Prefeitura do Campus de USP de Ribeirão Preto.

Os protocolos experimentais utilizados para aquisição dos dados do presente estudo estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram avaliados, e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP, SP, Brasil), Protocolos (016/2013.1 e 023/2013.1).

3.2 Procedimentos cirúrgicos

Nos estudos de onde foram resgatados os registros de PA, os ratos foram anestesiados com uma mistura de cetamina (50 mg/kg, ip) e xilazina (10 mg/kg i.p.) e instrumentados com cateteres de polietileno na a. femoral (N=10) ou carótida (N=9). Outro grupo de ratos (N=13), sob o mesmo tipo de anestesia (cetamina/xylazina) foram instrumentados com um cateter de polietileno na aorta abdominal, abaixo da emergência das artérias renais, por meio de uma ampla laparotomia mediana.

Todos procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições de assepsia adequada e os ratos receberam analgésico e antibiótico após os procedimentos. Os animais com cateteres na a. femoral ou carótida ficaram em recuperação em gaiolas individuais com livre acesso à água e ração pro 48h enquanto aqueles cateterizados por laparotomia (aorta abdominal) ficaram em recuperação cirúrgica por 5 dias.

3.3 Processamento dos dados

Os arquivos com os registros de PA foram processados pelo programa computacional (Blood Pressure Module for LabChart 7, ADInstruments, Sydney, Australia) para geração de séries de valores sucessivos (batimento a batimento) da PA sistólica e IP (intervalo de tempo entre sucessivos valores de PA sistólica).

As séries temporais foram inspecionadas visualmente e passaram por um processo semi-automatizado para correção de valores oriundos de batimentos

ectópicos ou artefatos de registro (SILVA; FAZAN; MARIN-NETO, 2020). Para essa correção, inicialmente uma curva de mediana móvel da série é calculada com o tamanho da janela definido pelo usuário. Dois limites de tolerância são definidos como a curva da mediana móvel deslocada para "cima" e para "baixo" em uma porcentagem também definida pelo usuário. Os valores da série que excedem os limites de tolerância são automaticamente identificados como artefatos e substituídos por interpolação linear (Figura 4). Séries com mais de 2,5% dos valores identificados como artefatos, não foram utilizadas no estudo (RINCON SOLER *et al.*, 2018).

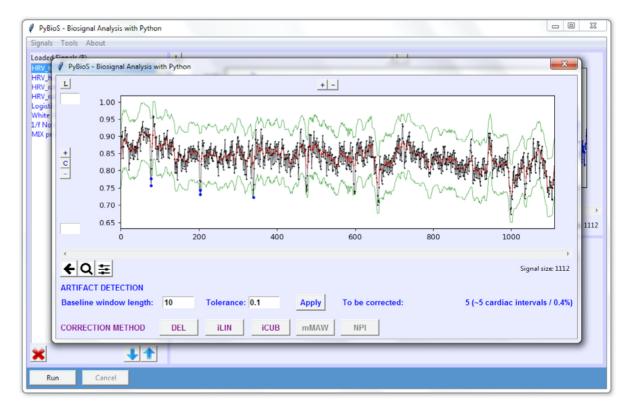


Figura 4 - Captura de tela da janela de correção de artefato no programa computacional PyBioS. O gráfico mostra a série original (linha preta), a curva da linha de base (linha vermelha) e os dois limites de tolerância (linhas verdes). Nesse exemplo, a janela de mediana móvel foi calculada a cada 10 valores, a tolerância foi de 10% e 5 valores da série (destacados em azul) foram identificados como artefatos, o que corresponde a, aproximadamente 0,4% do tamanho total da mesma.

3.3.1 Variabilidade total do intervalo de pulso e da PA sistólica

A variabilidade total dos valores de IP de cada animal foi avaliada no domínio do tempo através do cálculo do desvio padrão dos valores "normais" (livre de "artefatos") das séries de IP (SDNN). Da mesma forma, a variabilidade total da PA foi

calculada pelo desvio padrão (SD) dos valores das séries de PA sistólica. Diferenças entre sucessivos valores de IP, um índice de variabilidade total relacionado à atividade parassimpática cardíaca, foi calculado pela raiz quadrada da média do quadrado da diferença entre sucessivos valores de IP (RMSSD).

3.3.2 Análise espectral da variabilidade do intervalo de pulso e da PA sistólica

A análise da variabilidade do IP no domínio da frequência, cujo método mais comum é a análise espectral, baseia-se na identificação e quantificação de ritmos presentes nas séries temporais. As diferenças funcionais entre as duas divisões do sistema nervoso autonômico induzem a diferentes padrões de variabilidade do intervalo cardíaco, os quais somente são evidenciados quando esses parâmetros são expressos através de seus espectros (domínio da frequência).

Para isso, as séries temporais de IP e PA foram reamostradas em 10 Hz (1 valor a cada 100ms) por interpolação cúbica do tipo spline, para regularização do intervalo de tempo entre os batimentos. Em seguida, as séries com valores interpolados de IP e PAS foram analisadas em segmentos de 500 valores cada, com sobreposição de 50% (Protocolo de Welch) (WELCH, 1967).

Os espectros de cada segmento de IP e PA foram calculados pela Transformada Rápida de Fourier (FFT), após janelamento do tipo Hanning. Os espectros de IP foram integrados em bandas de baixa (LF: 0,20 a 0,80 Hz) e alta frequência (HF: 0,80 a 3,00 Hz), com os resultados expressos em valores absolutos (ms²) e unidades normalizadas (un). Já os espectros de PAS foram integrados somente na banda de baixa frequência (LF: 0,20 a 0,80 Hz) com os resultados expressos em valores absolutos (mmHg²). Os valores normalizados foram obtidos através do cálculo da porcentagem da potência de LF e HF com relação a potência espectral total, com a exceção da banda de muito baixa frequência (VLF: <0,20 Hz).

3.3.3 Dinâmica simbólica do intervalo de pulso e da PA sistólica

A variabilidade do IP e da PA também foi analisada por meio de um método não linear denominado análise simbólica. Este método, proposto por Porta e colaboradores (PORTA *et al.*, 2001) utiliza padrões de símbolos para classificar alterações entre sucessivos valores de IP e PA. As séries temporais tiveram seus valores máximos e mínimos identificados e, a partir destes, foram definidas 6 faixas de valores com igual magnitude. Os valores das séries foram simbolizados de acordo

com a faixa de cada um e analisados em sequências de 3 símbolos. Então, as sequencias de símbolos foram classificadas em 0V (sem mudança de faixa), 1V (uma mudança de faixa), 2LV (2 mudanças de faixa no mesmo sentido) e 2 UV (2 mudanças de faixa em sentidos opostos), como ilustrado na figura 5.

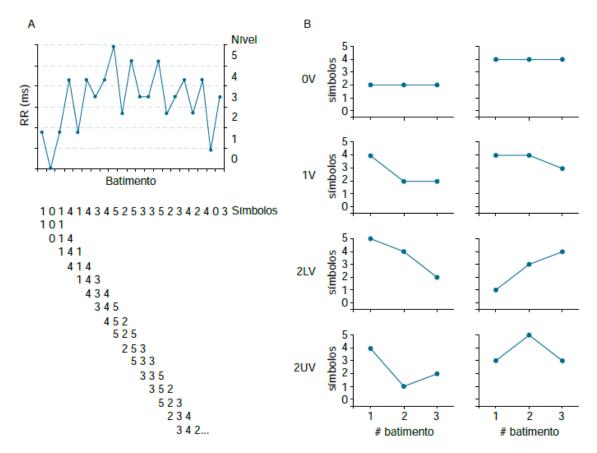


Figura 5 - (A) Ilustração da simbolização de uma série temporal em uma série de valores e (B) exemplos dos diferentes padrões de símbolos utilizados na dinâmica simbólica: nenhuma variação (0V), uma variação (1V), 2 variações em sentidos opostos (2UV) e 2 variações no mesmo sentido (2LV) (Adaptado de Silva et al., 2017).

3.3.4 Entropia amostral do intervalo de pulso

A entropia quantifica o grau de imprevisibilidade de uma série temporal e existem vários algoritmos propostos para esse fim, um dos mais utilizados é a entropia amostral (SampEn). A SampEn é precisamente o logaritmo natural negativo da condição de probabilidade que duas sequências similares por *n* pontos têm de permanecerem iguais até o próximo ponto, onde auto correspondentes não estão incluídos na probabilidade. Em resumo, quanto menor o valor da SampEn mais auto similar (menos complexa) é a série temporal (RICHMAN; MOORMAN, 2000).

3.4 Análise do barorreflexa espontâneo

3.4.1 Domínio do tempo (método da sequência)

3.4.1.1 Com séries originais

A SBR foi avaliada no domínio do tempo por meio do *Método da Sequência*, utilizando um programa computacional desenvolvido em nosso laboratório (CardioSeries v2.7 – http://www.danielpenteado.com). Descrito, inicialmente por (DI RIENZO et al., 1985) esse método utiliza séries temporais, batimento a batimento, com valores de IP e PAS. Inicialmente, as séries temporais são inspecionadas, automaticamente, a procura de rampas de PAS, ou seja, sequências pelo menos 3 valores consecutivos em que existam aumentos (ou reduções) sucessivos da PAS. Então, as séries de IP são, também automaticamente, "inspecionadas" a procura de sequências de valores onde os valores IP apresentam alterações sucessivas, e no mesmo sentido, dos valores da PAS. Alterações de PAS (aumentos ou quedas) que apresentam correlação linear (r²>0,8) com variações (no mesmo sentido) dos valores de IP são consideradas sequencias barorreflexas. No presente estudo foi adotado um atraso (*delay*) de 2 batimentos entre as rampas de PAS e as variações no IP para determinação das sequências barorreflexas. O coeficiente angular da reta da regressão linear entre sucessivos valores de PAS e IP foi utilizado para a avaliação da SBR. Vale destacar que além do delay de 2 batimentos, adotamos um limiar de 0,5 mmHg e 0,5 ms para considerar alterações nos valores adjacentes de PAS e IP, respectivamente.

Além de fornecer a SBR, o método da sequência permite também determinar o índice de efetividade do barorreflexo (BEI), ou seja, a razão entre o número total de rampas da PAS e o número de sequências barorreflexas. O BEI é um índice referente a quantidade de rampas de pressão que efetivamente promovem alterações reflexas no IP.

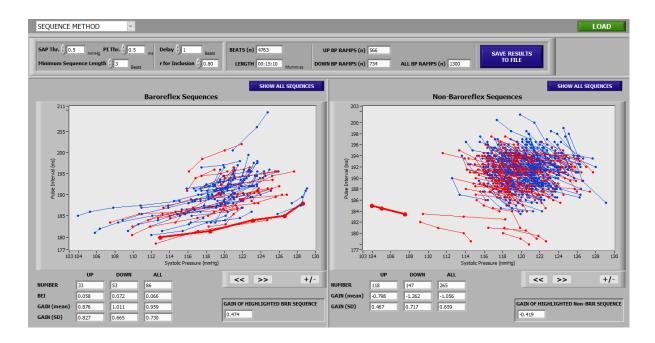


Figura 6 - Tela do programa CardioSeries, mostrando a aba de visualização de sequências barorreflexas e não barorreflexas. No painel superior são exibidos controles onde o usuário pode modificar o limiar para detecção de alterações na pressão arterial sistólica e intervalo de pulso, delay (em batimentos) e o valor de r (coeficiente de correlação linear).

3.4.1.2 Com séries filtradas

A partir das séries temporais originais de PA e IP, versões filtradas destas foram geradas utilizando um filtro Butterworth de 9ª ordem com frequência de corte de 0,8 Hz (SILVA *et al.*, 2019). Ao submeter as séries originais à filtragem passa-baixa (LP) as oscilações rápidas, acima da frequência de corte, são removidas, restando apenas oscilações lentas, ou baixa frequência, das séries. De modo correspondente, o filtro passa-alta (HP) remove todos os componentes oscilatórios lentos das séries, restando apenas aqueles cuja frequência está acima do valor de corte, ou seja, as oscilações rápidas.

A frequência de corte foi escolhida de acordo com os componentes espectrais da variabilidade cardiovascular de ratos. A figura 7 mostra exemplos de séries originais e filtradas de IP e PA.

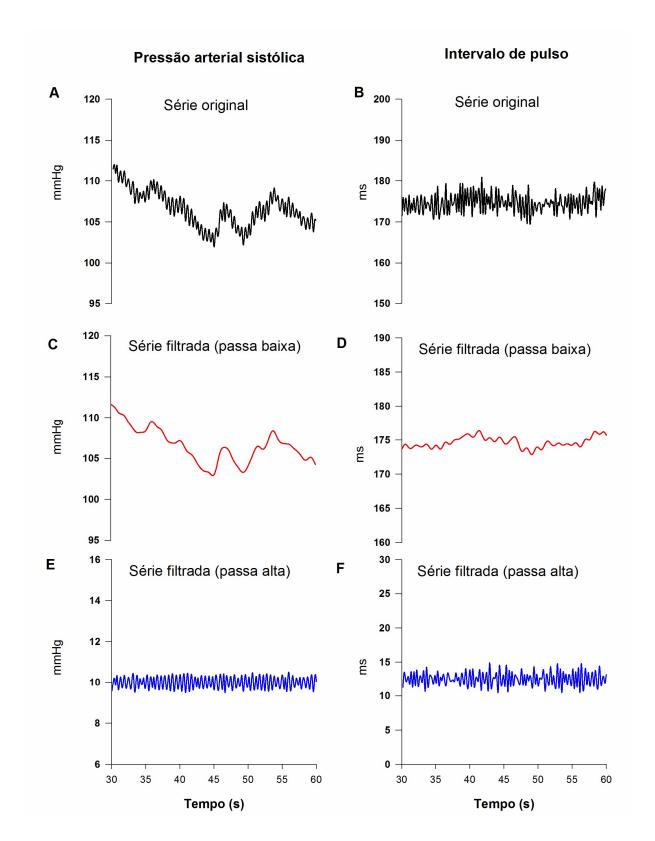


Figura 7 - Exemplos de séries originais e filtradas de pressão arterial sistólica e intervalo de pulso respectivamente (A-B), séries com filtragem passa baixa (C-D), e passa alta (E-F).

A análise de séries filtradas teve o objetivo de determinar a função barorreflexa para variações espontâneas da PA em velocidades distintas. Ou seja, oscilações lentas (séries filtradas em LP), ou rápidas da PA (séries filtradas em HP).

3.4.2 Sensibilidade barorreflexa avaliada no domínio da frequência (análise espectral cruzada)

A SBR também pode ser avaliada por métodos de análise no domínio da frequência, como, por exemplo, através da função de transferência na análise cruzada entre os espectros de PA e IP. Assim como para a realização da análise espectral (descrita acima), as séries de PAS e IP foram interpoladas (spline) para 10 Hz e divididas em segmentos com 512 valores com interpolação de 50%. Foi calculado o espectro cruzado das séries de PA (sinal de entrada) e IP (sinal de saída) por FFT. Os valores do espectro cruzado (função de transferência, ms/mmHg) foram computados sempre que a coerência da análise cruzada dos espectros foi superior a 0,5, nas bandas de baixa- (LF: 0,2 - 0,8 Hz) e alta-frequência (HF: 0,8 - 3,0 Hz). Então, análise no domínio da frequência forneceu valores de SBR para oscilações da PA em velocidades distintas, ou seja, oscilações lentas (LF) e rápidas (HF) (FREITAS, 2017).

3.5 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM).

A normalidade dos dados foi avaliada através do teste de D'agostino. O teste de análise de variância de uma via (ANOVA *one way*) foi utilizado quando as distribuições foram consideradas normais, seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*. Quando consideradas não normais, o teste de *Kruskal-Wallis* seguido de pós teste de *Dunn* foi aplicado. Diferenças foram consideradas significativas quando p<0,05.

Resultados 35

4.1 Valores hemodinâmicos basais

A figura 8 apresenta traçados de pressão arterial pulsátil de um rato representativo de cada um dos diferentes grupos estudados. Como podemos observar tanto os ratos cateterizados na artéria femoral, quanto na carótida ou na aorta abdominal fornecem um registro invasivo de pressão arterial de boa qualidade.

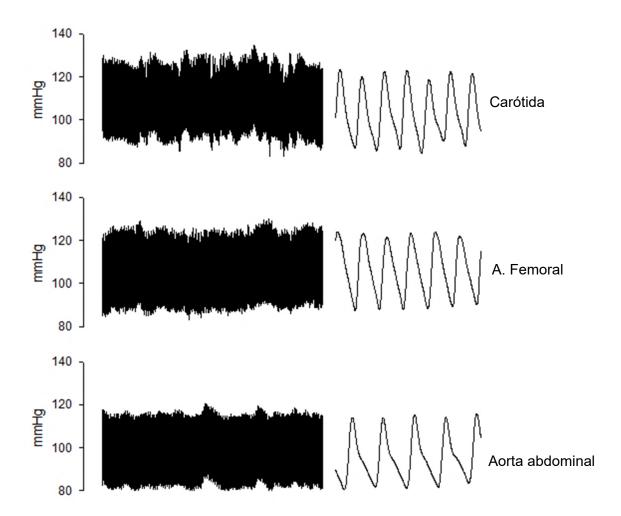


Figura 8 - Traçados representativos do sinal de registro da pressão arterial pulsátil (PAP) em ratos submetidos a cateterização da femoral, carótida e aorta abdominal por técnica não oclusiva. O traçado escuro representa a PAP ao longo de 1 minuto e o traçado claro ao longo de 1 segundo.

A figura 9 mostra a FC e a PA sistólica nos diversos grupos estudados. Ratos submetidos à cateterização da carótida apresentaram maior FC do que os demais grupos estudados. Por outro lado, ratos submetidos a cateterização da artéria femoral apresentaram maior PA quando comparados aos animais cateterizados através da técnica não oclusiva da aorta abdominal.

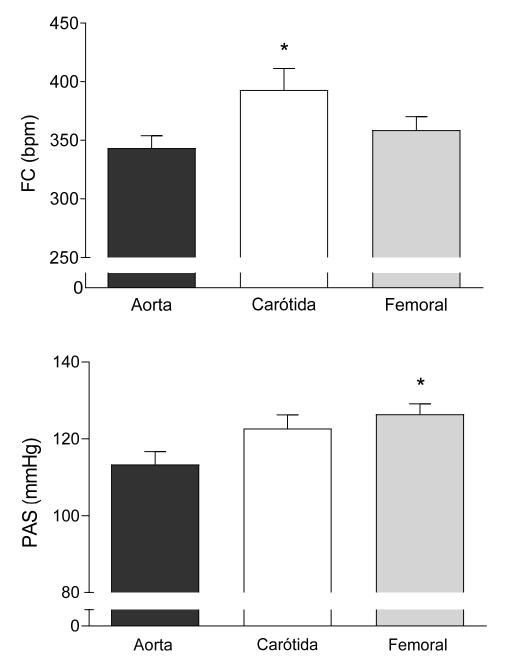
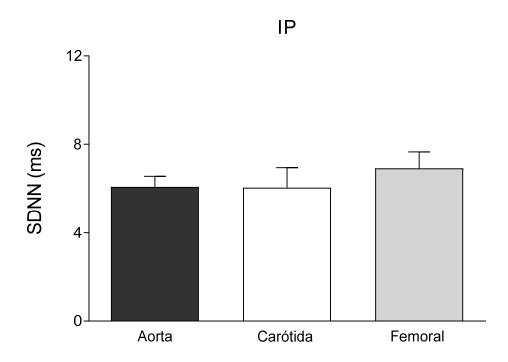


Figura 9 - Valores basais (média ± EPM) da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial sistólica (PAS) de ratos submetidos ao registro de PA através da cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral. * p<0,05 comparado ao grupo aorta.

4.2 Variabilidade total do intervalo de pulso e da PA sistólica

A figura 10 mostra a variabilidade total do IP, no domínio do tempo, através do SDNN (desvio padrão de valores normais das séries de IP) e da RMSSD (raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre valores sucessivos de IP). Todos os grupos apresentaram valores semelhantes para os parâmetros avaliados.



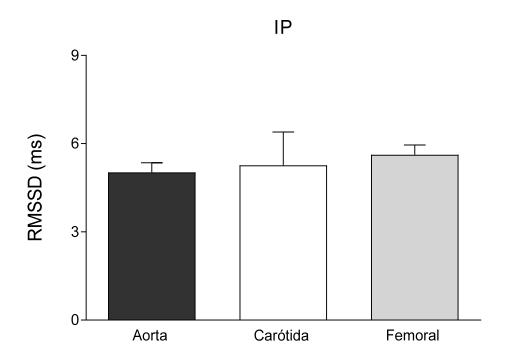


Figura 10 - Valores (média ± EPM) do desvio padrão das séries de IP (SDNN), representando a variabilidade total do intervalo de pulso (IP) [painel superior] e da raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre valores sucessivos de IP, representando a variabilidade entre sucessivos intervalos de pulso [painel inferior], em ratos submetidos ao registro de PA através da cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral.

A figura 11 mostra a variabilidade total dos valores da PA sistólica. Os animais submetidos a cateterização na artéria femoral apresentaram uma tendência de aumento do SD (desvio padrão dos valores de PA) em relação aos demais grupos, entretanto, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos estudados (p=0,08).

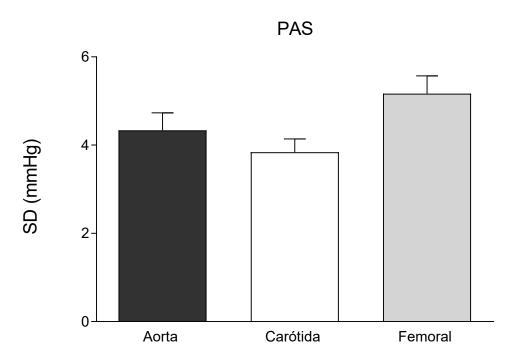


Figura 11 - Valores (média ± EPM) do desvio padrão (SD) dos valores de PA, representando a variabilidade desse parâmetro no domínio do tempo, de ratos submetidos ao registro de PA através da cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral.

4.3 Análise espectral do intervalo de pulso e da PA sistólica

A figura 12 mostra os valores de potência dos espectros do IP nas bandas de LF e HF. A potência do espectro na banda de LF está representada em unidades normalizadas (un), enquanto na banda de HF ela está em unidades absolutas (ms²). Não foram observadas diferenças entre os resultados obtidos nos três grupos estudados.

A figura 13 mostra os valores da potência do espectro da PAS na banda de LF. O grupo de animais submetidos ao registro da PA através da cateterização oclusiva da artéria femoral apresentou aumento marcante na potência da banda de baixa frequência do espectro da PAS em comparação aos demais grupos.

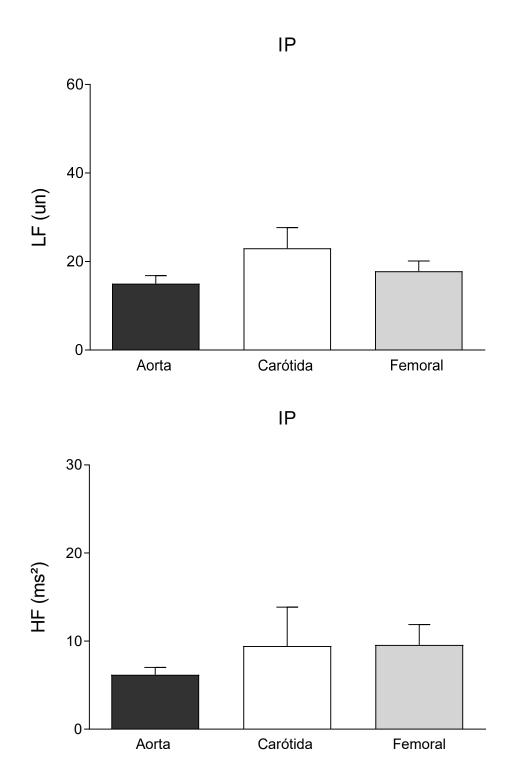


Figura 12 - Valores (média ± EPM) da potência do espectro de IP nas bandas de baixa- (LF) [painel superior] e alta-frequência (HF) [painel inferior], em unidades normalizadas (nu) e absolutas (ms²), respectivamente, de ratos com cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral.

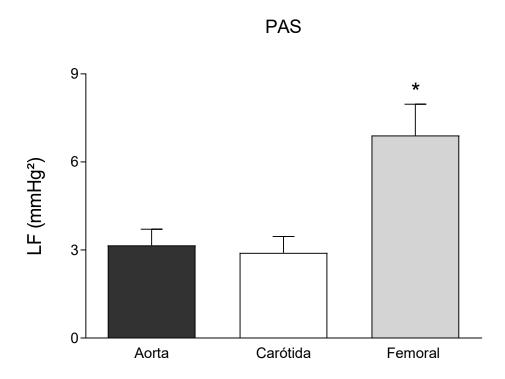


Figura 13 - Valores (média ± EPM) da potência do espectro de PA sistólica, na banda de baixa-frequência (LF), de ratos com cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral. * p<0,05 comparado ao demais grupos.

4.4 Análise simbólica do intervalo de pulso e da PA sistólica

A figura 14 mostra a variabilidade do IP avaliada através da dinâmica simbólica. Não foram observadas diferenças nos resultados obtidos nos três grupos estudados na ocorrência de padrões de sequência com uma variação (1V) ou duas variações em sentidos diferentes (2UV).

A figura 15 mostra dinâmica simbólica dos valores de PA. O grupo de animais submetidos ao registro da PA através da cateterização da a. femoral apresentou um aumento na incidência dos padrões tipo 1V em comparação com os animais que tiveram a PA registrada através da cateterização não oclusiva da aorta abdominal.

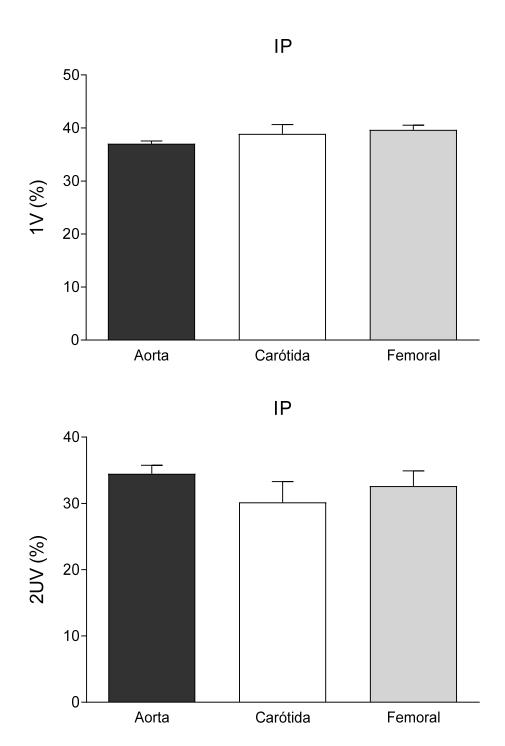


Figura 14 - Resultados da análise simbólica das séries de IP, mostrando a porcentagem (média ± EPM) de sequências de símbolos com variação do tipo 1V [painel superior] e 2UV [painel inferior] de ratos com cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral.

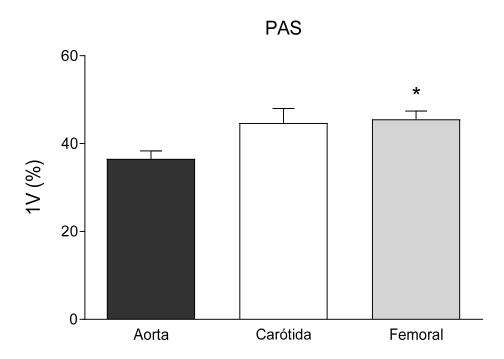


Figura 15 - Resultados da análise simbólica das séries de PA, mostrando a porcentagem (média ± EPM) de sequências de símbolos com variação do tipo 1V em ratos com cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral. * p<0,05 comparado ao grupo aorta.

4.5 Entropia do intervalo de pulso

A figura 16 mostra os valores de entropia amostral (SampEn) nos três grupos de animais estudados. Os grupos estudados apresentaram valores semelhantes de entropia.

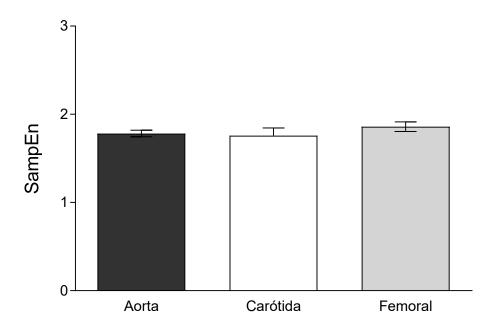


Figura 16 - Valores (média ± EP) de entropia amostral de ratos submetidos ao registro da PA através da cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral.

4.6 Função barorreflexa avaliada pelo método da sequência

4.6.1 Em séries originais

A figura 17 mostra a SBR avaliada pelo método da sequência (em séries originais) dos animais dos três grupos estudados. Os ratos submetidos ao registro da PA através da cateterização oclusiva da a. femoral apresentaram menor SBR quando comparados aos animais submetidos a cateterização não oclusiva da aorta abdominal. Não foram encontradas diferenças no BEI calculado dos três grupos do estudo.

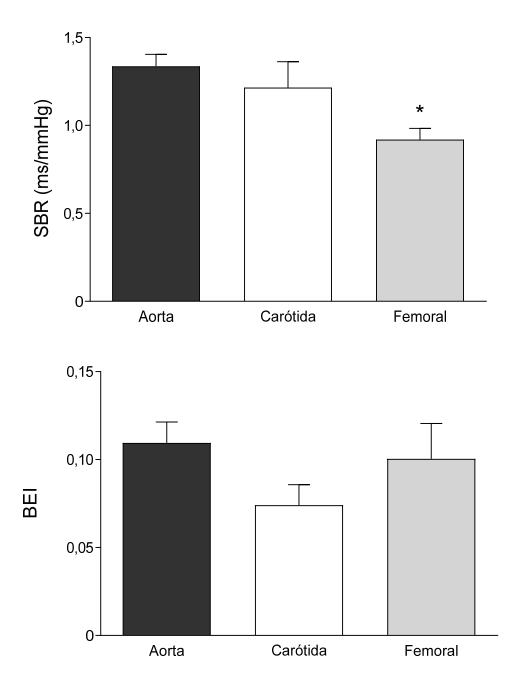


Figura 17 - Valores (média ± EPM) do da sensibilidade do barorreflexo espontâneo (SBR) [painel superior] e do índice de efetividade do barorreflexo (BEI) [painel inferior] avaliados pelo do método da sequência em séries de PA e IP de ratos com cateterização não oclusiva da aorta abdominal ou oclusiva da carótida ou da artéria femoral. * p<0,05 comparado ao grupo aorta.

4.6.2 Em séries filtradas

A figura 18 mostra o ganho (SBR) calculado através do método da sequência das séries de PA e IP com filtragem LP e HP, respectivamente. Os animais submetidos ao registro de PA por cateterização oclusiva da artéria femoral apresentaram menor SBR nas séries filtradas em LP quando comparados aos animais submetidos a cateterização oclusiva da carótida e aos animais cateterizados na aorta abdominal nas séries filtradas em HP.

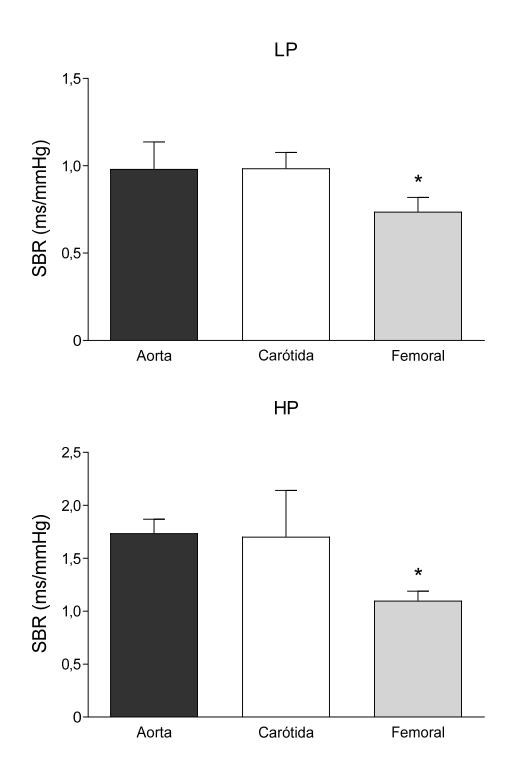


Figura 18 - Valores (média ± EPM) da sensibilidade do barorreflexo espontâneo (SBR), avaliada pelo método da sequência, em séries de PA e IP submetidas a filtragem passa baixa [painel superior] ou passa alta [painel inferior]. * p<0,05 comparado aos demais grupos.

4.7 Sensibilidade do barorreflexo espontâneo avaliada no domínio da frequência (análise espectral cruzada)

A figuras 19 mostra a magnitude da função de transferência (espectro cruzado) entre IP e PA (SBR) nas bandas de LF e HF. Apesar dos animais submetidos à cateterização oclusiva da a. femoral terem apresentado um valor inferior da SBR na banda de LF em comparação aos outros grupos avaliados, não houve diferença significativa entre os grupos (p=0,09). Na banda de HF também não foram encontradas diferenças entre a SBR dos três grupos estudados.

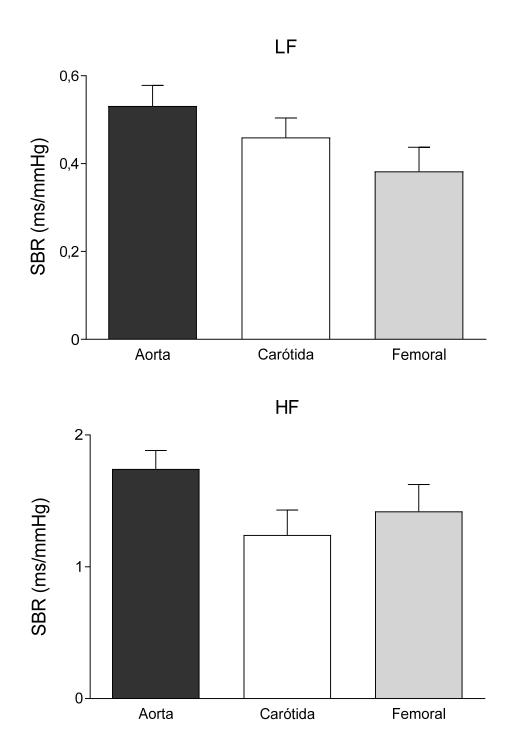


Figura 19 - Valores (média ± EPM) da sensibilidade barorreflexa (SBR) nas bandas de baixa- (LF) [painel superior] ou alta-frequência (HF) [painel inferior] avaliada através da função de transferência entre espectros da IP e PA (análise espectral cruzada).

4.8 Correlação entre os diferentes métodos de análise da SBR

A tabela 1 mostra os coeficientes de correlação da SBR calculada através das séries originais pelo método da sequência, das bandas de alta- (HF) e baixa-frequência (LF) pela função de transferência e da SBR obtida das séries filtradas em passa baixa (LP) e passa alta (HP). As séries originais apresentaram uma alta correlação (< 0,7) com as séries filtradas em HP em todos os grupos avaliados. Além disso, apresentaram também alta correlação com a SBR obtida na banda de HF através da função de transferência em dois dos grupos avaliados.

A SBR obtida na banda de LF através da função de transferência pelo método da analise espectral cruzada demonstrou uma forte correlação (< 0,7) com a SBR obtida das séries filtradas em LP em dois dos três grupos avaliados.

Coeficiente de correlação (r) SBR original (método da sequência)			
LF	0,59*	0,6	-0,05
HF	0,78*	0,82*	0,01
LP	0,75*	0,38	-0,15
HP	0,84*	1*	0,81*
		LF (Função de transferên	icia)
LP	0,81*	0,0004	0,73*
HP	0,56*	0,6	0,24
		HF (Função de transferêr	ncia)
LP	0,53	0,39	0,69*
HP	0,76*	0,68	0,4

Tabela 1 - Coeficiente de correlação entre a sensibilidade barorreflexa (SBR) das séries originais obtidas através do método da sequência, SBR das bandas de LF e HF obtidas através da função de transferência e da SBR das filtradas em LP (passa baixa) e HP (passa alta). (Analise estatística: Coeficiente de Pearson para valores paramétricos e Coeficiente de Spearman para não paramétricos). *p<0,05 é estatisticamente significativo.

Este foi o primeiro estudo a comparar os efeitos da cateterização de diferentes territórios vasculares na modulação autonômica cardiovascular e na função do barorreflexo arterial. Apesar das diferentes técnicas de cateterização arterial para registro direto da PA fornecerem sinais de qualidade semelhante, nossos resultados mostraram que existem diferenças em parâmetros cardiocirculatórios obtidos em ratos submetidos a diferentes procedimentos cirúrgicos de cateterização, confirmando a hipótese do estudo.

A cateterização não oclusiva da aorta abdominal, técnica desenvolvida para permitir o registro direto crônico da PA, requer um procedimento mais invasivo e tecnicamente complexo, comparado à cateterização de artérias periféricas e, por isso requer um período prolongado para a recuperação cirúrgica dos animais. No entanto, após a adequada recuperação, os ratos se encontram normalmente ativos, em boas condições gerais e sem qualquer sinal de dor, estresse ou desconforto. Então, podemos inferir que esse procedimento, apesar de ser mais complexo, é o que menos afeta as condições gerais dos ratos, por não comprometer a irrigação tecidual desses animais. Por isso, no presente estudo, as variáveis cardiovasculares foram comparadas entre os 3 grupos estudados por análise de variância e, quando diferenças foram encontradas, o pós-teste estatístico foi realizado tendo o grupo de cateterização não-oclusiva da aorta abdominal como controle.

Inicialmente destacamos que diferenças foram encontradas entre os valores basais da PA medida pelos diferentes acessos arteriais. Ratos com cateterização oclusiva de uma artéria femoral apresentaram maior PA basal. A artéria femoral comum é uma das maiores artérias do organismo. Ela é ramo da artéria ilíaca externa, sendo a principal (ou única) responsável pela irrigação do membro inferior (MOORE et al., 2010). Em seres humanos, quando ocorre uma obstrução dessa artéria, geralmente decorrente de doença aterosclerótica, é necessária uma intervenção urgente para evitar a amputação do membro afetado (SABALBAL; JOHNSON; MCALISTER, 2013). Com a redução gradual do fluxo na artéria femoral, o sangue pode atingir a artéria poplítea (ramo terminal da artéria femoral) por anastomoses geniculares, que se desenvolvem com o tempo. No entanto, se o fluxo na artéria femoral de uma perna for interrompido repentinamente, é pouco provável que o fluxo sanguíneo distal seja suficiente (SABALBAL; JOHNSON; MCALISTER, 2013). A anatomia arterial da pata posterior de ratos tem grande similaridade com a de seres humanos (GREENE, 1935), nos permitindo inferir que a cateterização oclusiva da

artéria femoral externa de ratos leva, inexoravelmente, a uma isquemia maciça da pata do animal. A privação de fluxo sanguíneo ao músculo esquelético leva à deficiência funcional contrátil, além de respostas inflamatórias local e dor intensa (BLAISDELL, 2002). Então, é razoável supor que a maior PA basal observada nos ratos com obstrução da artéria femoral deva ter, pelo menos em parte, a contribuição de um aumento da atividade simpática resultante da isquemia muscular da pata afetada desses animais.

Ratos que tiveram o fluxo na carótida comum interrompido pela cateterização mostraram-se taquicardíacos em comparação àqueles submetidos à cateterização não-oclusiva da aorta. O encéfalo é um tecido nobre do organismo irrigado por dois sistemas: o vertebro-basilar (artérias vertebrais) e o carotídeo (carótidas internas). As artérias vertebrais se anastomosam formando a artéria basilar, que se divide em 2 artérias cerebrais posteriores. As carótidas internas originam, em cada lado, uma artéria cerebral média e uma artéria cerebral anterior. Na base do crânio esse conjunto de artérias cerebrais se anastomosam formando o círculo arterial cerebral, conhecido como círculo arterial de Willis (nomeado em homenagem a Thomas Willis: 1621-1673). Esse círculo arterial cria uma redundância na circulação cerebral, de modo que se o fluxo sanguíneo de uma das artérias for interrompido, o fluxo dos outros vasos pode preservar a irrigação cerebral o suficiente para minimizar a isquemia.

No rato, o sistema arterial cérebro-basilar é proporcionalmente menos desenvolvido do que em humanos (GINSBERG; BUSTO, 1989). Entretanto, o círculo arterial cerebral também existe em ratos, protegendo o encéfalo desses animais contra a isquemia cerebral caso o fluxo sanguíneo de alguma artéria seja interrompido (GINSBERG; BUSTO, 1989). Então, podemos especular que as repercussões isquêmicas da cateterização oclusiva de uma das carótidas comuns são menos intensas que as causadas pela oclusão de uma artéria femoral. Porém, é importante destacar aqui que a interrupção do fluxo sanguíneo de uma carótida comum vai desativar, completamente, o conjunto de barorreceptores arteriais localizado no seio carotídeo do lado da artéria obstruída. O barorreflexo arterial, principal mecanismo para correção rápida de alterações da PA, é um importante reflexo inibidor da atividade simpática e estimulador da atividade vagal (parassimpática) cardíaca (ZUCKER, 1991). A aferência desse reflexo, os barorreceptores arteriais, que se concentram nos seios carotídeos e na curvatura da aorta, são parcialmente ativos em PA normal (ZUCKER, 1991). Assim, é razoável supor que a desativação de parte

desses receptores, decorrentes da interrupção do fluxo sanguíneo em uma carótida, pode promover alguma alteração no balanço autonômico, porém hipotetizamos que seja compensado pela atividade dos barorreceptores aórticos e carotídeos restantes.

Para avaliar alterações da atividade modulatória do sistema nervoso autônomo sobre o sistema cardiocirculatório, utilizamos índices de variabilidade da FC e da PA nos 3 grupos estudados. É consenso que o estudo das oscilações espontâneas da FC e da PA, fornece importantes informações sobre o sistema cardiocirculatório, especialmente sobre a modulação autonômica deste (TASK FORCE, 1996). Índices da variabilidade natural da FC e da PA, calculados por meio de uma variedade de métodos matemáticos, representam valiosos marcadores da função autonômica, diretamente relacionado com risco cardiovascular (BINKLEY *et al.*, 1993; KLEIGER *et al.*, 1987).

Os índices da variabilidade total do IP (SDNN e RMSSD) e da PA (SD), foram similares entre os grupos. Tais índices são largamente utilizados e guardam estreita correlação com a modulação autonômica cardiovascular (TASK FORCE, 1996), no entanto, não permitem distinguir alterações na modulação das divisões, simpática e parassimpática do SNA. Portanto, é importante se avaliar as características oscilatórias do IP e da PA através de outras ferramentas.

A análise espectral das séries de IP surgiu como alternativa na década de 1980 afim de quantificar e identificar esses ritmos. A potência do espectro, tanto da FC, como da PA, na banda de LF é mediada principalmente pelo sistema nervoso simpático e depende da integridade dos barorreceptores (TASK FORCE, 1996). Já a potência do espectro da FC na banda de HF (ritmo respiratório) representa a modulação vagal (AKSELROD et al., 1981). O presente estudo observou aumento da potência do espectro da PA na banda de LF, fenômeno conhecido como ondas de Mayer, dos animais cateterizados na artéria femoral. Vários aspectos podem estar envolvidos nesse achado, tais como: a isquemia muscular da pata do animal diretamente provocando uma condição de hiperatividade simpática; a ativação neurohumoral de citocinas e mediadores inflamatórios locais aos quais podem comprometer a regulação autonômica (HELWIG et al., 2008; NIIJIMA et al., 1991); quadros de algesia provocados pelo procedimento invasivo e que também podem ativar os sistemas de estresse e comprometer o controle neural cardiovascular (KOENIG et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2012). Além disso, nesse mesmo grupo de animais foram observados os maiores valores de PA, o que vai ao encontro da hiperatividade

simpática e sua potente atividade vasoconstritora (FINK, 2009).

Também foi observado um aumento na incidência dos índices de 1V da dinâmica simbólica dos intervalos de PA dos animais cateterizados através artéria femoral. Diferente da análise espectral, a análise simbólica e a entropia são alternativas não lineares da avaliação autonômica cardiovascular, ou seja, assumem que as séries temporais são compostas por sistemas complexos e que componentes oscilatórios não são independente e interagem entre si. Desse modo, diversos estudos já mostraram a eficiência da dinâmica simbólica e mostraram que alguns de seus índices estão fortemente correlacionados com a modulação autonômica no sistema cardiovascular (GUZZETTI et al., 2005; PORTA et al., 2007a; TOBALDINI et al., 2009). Os métodos clássicos de interpretação dos resultados da dinâmica simbólica propõem que o padrão 0V representa a modulação simpática, enquanto o 2UV representa a modulação vagal. No entanto, a maioria dos trabalhos que validaram esses padrões foram realizados em humanos. Recentemente, trabalhos do nosso grupo de pesquisa buscaram validar a dinâmica simbólica em ratos correlacionando esse método ao uso de fármacos bloqueadores de receptores autonômicos (atenolol, metilatropina) e mostraram a importância de se considerar o padrão 1V para avaliação da modulação simpática nesses animais. Em suma, a incidência de padrões 1V se mostrou um índice mais consistente que o 0V tanto nas séries de IP quanto de PA, e guarda informações importantes a respeito da modulação simpática cardíaca (SILVA et al., 2017).

A medida da entropia das séries de IP surgiu como uma medida da complexidade da FC e também fornece informações relevantes a respeito da atividade autonômica. Basicamente, consiste na quantificação do número de informações geradas em um determinado período de tempo de uma amostra, quando as amostras anteriores são conhecidas. Quanto menor for a quantidade de informações (entropia), mais regular e previsível são as series (PORTA et al., 2007b; RICHMAN; MOORMAN, 2000). Desse modo, reduções na entropia já foram amplamente relatadas em diversas doenças e condições experimentais em que já se é conhecidos o aumento da modulação simpática (e redução da modulação vagal), tais como testes de ortostatismo passivo e infusão de nitroprussiato (FRANÇA DA SILVA et al., 2016; PORTA et al., 2007b; TOBALDINI et al., 2013). Todavia, os valores da entropia amostral aqui avaliados foram similares entre os grupos.

A análise do barorreflexo espontâneo tem aberto inúmeras possibilidades para melhor compreender a função barorreflexa em diversas situações. Embora, vários

métodos tenham sidos descritos nos últimos anos, o método da sequência é um dos mais utilizados (LAUDE et al., 2004; DE MARIA et al., 2018). Esse método nãoinvasivo substitui o clássico método farmacológico de avaliação do barorrreflexo, onde são necessárias alterações súbitas da PA pela administração de drogas vasoativas como a angiotensina II, fenilefrina e/ou o nitroprussiato de sódio. Diversos autores já evidenciaram a eficácia do método da sequência na análise da função barorreflexa, uma vez que a desnervação dos barorreceptores reduz de maneira drástica a quantidade de sequências barorreflexas (DI RIENZO et al., 1985). Desse modo, o presente estudo traz como um de seus principais resultados, que as diversas repercussões citadas anteriormente decorrentes da cateterização oclusiva da artéria femoral tem potencial de influenciar e reduzir a sensibilidade do barorreflexo. Já foi evidenciado que o aumento dos níveis de citocinas e mediadores inflamatórios circulantes está intimamente relacionado com a diminuição da SBR (SUBHA et al., 2016; TAKAGISHI et al., 2010). Destacamos que durante o período de realização dos experimentos deste estudo, foram realizadas coletas de amostras sanguíneas com objetivo de identificar a presença mediadores inflamatórios sistêmicos em alguns animais com cateter na artéria femoral, os quais se mostraram indetectáveis (resultados não apresentados). Desse modo, podemos sugerir que um processo inflamatório acontece apenas localmente na região afetada pela implantação do cateter. Uma das vias do componente eferente do barorreflexo advém de projeções de neurônios GABAérgicos localizados no bulbo ventrolateral caudal (CVLM), principal componente inibitório dos neurônios pré-ganglionares simpáticos da área ventrolateral rostral (SCHREIHOFER; GUYENET, 2002). Dessa forma, a ativação tônica simpática decorrente da inflamação e da dor também pode ser um fator responsável por contribuir com a diminuição da SBR (KOENIG et al., 2014; MARTELLI; FARMER; YAO, 2016).

Por outro lado, a análise do barorreflexo pelo método da sequência traz algumas limitações. No caso de humanos, apenas 20 a 30% das rampas de PA são associadas a variações de IP no mesmo sentido (DI RIENZO *et al.*, 2001). Além disso a "quebra" das rampas de PA, devido às flutuações respiratórias (alta frequência), parece configurar outra limitação importante do método da sequência (DI RIENZO *et al.*, 2001). Em outras palavras o método da sequência parece não ser capaz de medir os componentes lentos do barorreflexo. Além disso, alguns autores já relataram que a SBR calculada através do método da sequência nas séries originais é altamente

relacionado a SBR calculada pela análise espectral cruzada na banda de alta frequência (HF), mas não na de baixa frequência (LF) (OOSTING; STRUIJKER-BOUDIER; JANSSEN, 1997; STAUSS *et al.*, 2006).

Uma alternativa para medir os componentes lentos do barorreflexo usando o método da sequência é filtrar os componentes oscilatórios de alta frequência do IP e da PA (criando as séries filtradas em LP) antes de aplicar o método da sequência. Nesse caso, os componentes respiratórios são removidos, prevenindo as rampas de PA de serem interrompidas a cada, aproximadamente 3 batimentos, pelas oscilações respiratórias da pressão. As análises do presente estudo envolvendo as séries filtradas em LP mostraram resultados interessantes. Por um lado, o ganho (SBR) das séries filtradas em HP (onde somente oscilações de alta frequência estão presentes) é capaz de representar, por ele mesmo a SBR das séries originais. Por outro, em dois dos três grupos avaliados, a SBR calculada a partir das series filtradas em LP apresentaram alta correlação com SBR na banda de baixa frequência (LF) calculada pela função de transferência da análise espectral cruzada entre PA e IP. Portanto, para medir tanto os componentes rápidos quanto lentos do barorreflexo através do método da sequência, é importante utilizar não só as series originais, mas também as series filtradas em LP. Desse modo, enquanto as séries originais refletem os componentes rápidos, as series LP vão representar os componentes lentos do barorreflexo (SILVA et al., 2019).

Dessa maneira, além de apontar algumas limitações do método da sequência, a análise da SBR utilizando séries filtradas, vai ao encontro dos resultados obtidos com as séries originais, tanto pelo método da sequência, quanto pela função de transferência. De modo, que a cateterização da artéria femoral parece afetar de maneira prejudicial o barorreflexo nesses animais, enquanto a cateterização unilateral da carótida comum não promoveu alterações na SBR.

Para nossa surpresa, os ratos com cateterização oclusiva de uma carótida comum não apresentaram alterações na função barorreflexa avaliada por quaisquer dos métodos utilizados. Existem relatos na literatura de que a oclusão bilateral das carótidas promove uma notável resposta hipertensora. Essa resposta é provocada pela desativação completa dos barorreceptores carotídeos, e ativação dos quimiorreceptores frente a condições de hipóxia decorrentes da redução do fluxo sanguíneo nessas artérias. Dessa forma, estabelece-se uma condição de disautonomia, de modo que a ativação dos quimiorreceptores promove o aumento da

modulação simpática vascular (aumentando a pressão arterial), enquanto o parassimpático promove a redução da frequência de batimentos no coração (LATARO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2004). No entanto, com exceção da taquicardia basal, esse grupo de animais apresentou resultados similares aos obtidos pela cateterização não oclusiva da aorta, tanto na variabilidade do IP e da PA, quanto no barorreflexo. Isso é sugestivo de que os barorreceptores aórticos, que estão intactos, juntamente com os demais barorreceptores presentes na carótida contralateral à cateterização, parecem ser suficientes para promover a manutenção e o controle autonômico cardiovascular. Além disso, não podemos descartar a possibilidade da existência de algum mecanismo subjacente participando da regulação desse eixo em condições de oclusão.

Os resultados apresentados no presente estudo apontaram mostraram os efeitos deletérios que acometeram os animais com cateterização oclusiva na artéria femoral, levando ao prejuízo no balanço autonômico (disautonomia). No entanto, é importante destacar a consistência dos dados apresentados pelos animais com cateter na aorta abdominal. Essa técnica preserva de maneira importante o sistema cardiocirculatório, de modo que os animais desse grupo exibiram menores valores de FC e PA, que os demais grupos em mesmas condições. Ademais, esses animais exibiram grande consistência nas análises de variabilidade do IP e PA, o que nos permite confirmar a existência de melhores condições de preservação do sistema vascular e consequentemente menor ativação dos sistemas reguladores do estresse. Além disso, o grupo aorta apresentou melhor sensibilidade barorreflexa avaliada pelo método da sequência. Desse modo, apesar de maior complexidade cirúrgica e tempo de recuperação, essa técnica parece ser o padrão-ouro dos métodos de cateterização com objetivo de minimizar as repercussões cardiocirculatórias e manter melhores condições gerais dos animais.

Contudo, um ponto a ser mencionado, é que a técnica de cateterização através da carótida comum promoveu uma resposta de taquicardia nos animais. No entanto, quando comparada com o método que acreditamos ser "padrão-ouro" de cateterização (aorta), e como discutido anteriormente, a carótida exibiu um padrão de resultados bastante similares, tanto nas análises da VFC (SDNN, RMSSD, Dinâmica simbólica e entropia) quanto na sensibilidade do barorreflexo, apresentando-se como uma boa alternativa para pesquisadores que buscam investigar o balanço simpatovagal e a função barorreflexa em ratos.

Portanto, podemos concluir que os efeitos deletérios da cateterização oclusiva, ocorrendo principalmente na artéria femoral podem influenciar sobremaneira parâmetros cardiovasculares e índices de VFC. No entanto, apesar de requerer uma cirurgia de maior porte, a cateterização da aorta abdominal parece ser uma importante ferramenta para estudos que buscam realizar registros prolongados da PA, e se estabelece como um bom método para a coleta de dados com finalidade de avaliar o balanço simpato-vagal cardíaco e a função barorreflexa. Em contrapartida, a cateterização carótida se mostrou um método eficaz de registro da PA com menos repercussões que a femoral, apresentando-se também como uma alternativa viável para essa finalidade.

Por fim, é importante considerar o potencial efeito da abordagem cirúrgica escolhida em procedimentos experimentais que visam o registro da pressão arterial e análise hemodinâmica e da modulação cardiovasculares em ratos não anestesiados.

AKSELROD, S. *et al.* Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. **Science**, Washington, DC, v. 213, n. 4504, p. 220–222, 10 Jul. 1981.

APPELHANS, B. M.; LUECKEN, L. J. Heart rate variability as an index of regulated emotional responding. **Review of General Psychology**, Thousand Oaks, v. 10, n. 3, p. 229–240, Sep. 2006.

BENGIS, R. G. Effects of prolonged blockade of the renin-angiotensin system on blood pressure control in rats. 1978. Tese (Doutorado) — Department of Physiology and Biophysics, University of Missisipi Medical Center, Jackson, 1978.

BINKLEY, P. F. *et al.* Sustained augmentation of parasympathetic tone with angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with congestive heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v. 21, n. 3, p. 655–661, 1993.

BLAISDELL, F. W. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. **Cardiovascular surgery (London, England)**, v. 10, n. 6, p. 620–630, dec. 2002.

BRISTOW, J. D. *et al.* Diminished Baroreflex Sensitivity in High Blood Pressure. **Circulation**, v. 39, n. 1, p. 48–54, jan. 1969.

CHATTIPAKORN, N. *et al.* Heart rate variability in myocardial infarction and heart failure. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 120, n. 3, p. 289–296, 3 Sep. 2007.

DE MARIA, B. *et al.* Separating arterial pressure increases and decreases in assessing cardiac baroreflex sensitivity via sequence and bivariate phase-rectified signal averaging techniques. **Medical & biological engineering & computing**, v. 56, n. 7, p. 1241–1252, jul. 2018.

DI RIENZO, M. *et al.* A new method for evaluating the baroreflex role by a joint pattern analysis of pulse interval and systolic blood pressure series. **Medical & Biological Engineering & Computing**, New York, v. 23, p. 313–314, 1985.

DI RIENZO, M. *et al.* Baroreflex effectiveness index: an additional measure of baroreflex control of heart rate in daily life. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 280, n. 3, p. R744–R751, 1 Mar. 2001.

FAIRCHILD, K. D. *et al.* Endotoxin depresses heart rate variability in mice: cytokine and steroid effects. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 297, n. 4, p. R1019–R1027, Oct. 2009.

FINK, G. D. Sympathetic activity, vascular capacitance and long-term regulation of arterial pressure. **Hypertension**, Dallas, v. 53, n. 2, p. 307–312, Feb. 2009.

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**, Malden, v. 21, n. 3, p. 223–235, May 2016.

FREITAS, I. M. G. Função barorreflexa arterial espontânea da frequência cardíaca em pacientes com hipertensão resistente. 2017. Tese (Doutorado em Saúde) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

GINSBERG, M. D.; BUSTO, R. Rodent models of cerebral ischemia. **Stroke**, v. 20, n. 12, p. 1627–1642, dec. 1989.

GOLDBERGER, J. J. *et al.* American Heart Association/American College of Cardiology Foundation/Heart Rhythm Society Scientific Statement on Noninvasive Risk Stratification Techniques for Identifying Patients at Risk for Sudden Cardiac Death. A scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology Committee on Electrocardiography and Arrhythmias and Council on Epidemiology and Prevention. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v. 52, n. 14, p. 1179–1199, 30 Sep. 2008.

GORDAN, R.; GWATHMEY, J. K.; XIE, L.-H. Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. **World journal of cardiology**, v. 7, n. 4, p. 204–214, 26 apr. 2015.

GREENE E.C. Anatomy of the rat. Nature 137, 559, 1936.

GUZZETTI, S. *et al.* Symbolic dynamics of heart rate variability: a probe to investigate cardiac autonomic modulation. **Circulation**, Hagerstown, v. 112, n. 4, p. 465–470, 26 Jul. 2005.

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. **European Heart Journal**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 354-381, 1996.

HELWIG, B. G. *et al.* Central nervous system administration of interleukin-6 produces splenic sympathoexcitation. **Autonomic Neuroscience**, Amsterdam, v. 141, n. 1/2, p. 104–111, Aug. 2008.

KLEIGER, R. E. *et al.* Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. **The American Journal of Cardiology**, New York, v. 59, n. 4, p. 256–262, 1 Feb. 1987.

KLINGENHEBEN, T.; HOHNLOSER, S. H. Usefulness of risk stratification for future cardiac events in infarct survivors with severely depressed versus near-normal left ventricular function: results from a prospective long-term follow-up study. **Annals of Noninvasive Electrocardiology**, Malden, v. 8, n. 1, p. 68–74, Jan. 2003.

KOENIG, J. *et al.* Heart rate variability and experimentally induced pain in healthy adults: a systematic review: HRV nociceptive stimulation review. **European Journal of Pain**, London, v. 18, n. 3, p. 301–314, Mar. 2014.

LAUDE, D. *et al.* Comparison of various techniques used to estimate spontaneous baroreflex sensitivity (the EuroBaVar study). **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 286, n. 1, p. R226-231, jan. 2004.

LATARO, R. M. *et al.* Baroreceptor and chemoreceptor contributions to the hypertensive response to bilateral carotid occlusion in conscious mice. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 299, n. 6, p. H1990–H1995, Dec. 2010.

LESTAGE, P. *et al.* A chronic arterial and venous cannulation method for freely moving rats. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 13, n. 3/4, p. 213–222, May 1985.

LINDEN, D.; DIEHL, R. R. Estimation of baroreflex sensitivity using transfer function analysis: normal values and theoretical considerations. **Clinical autonomic research: official journal of the Clinical Autonomic Research Society**, v. 6, n. 3, p. 157–161, jun. 1996.

LOMBARDI, F.; STEIN, P. K. Origin of heart rate variability and turbulence: an appraisal of autonomic modulation of cardiovascular function. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 2, p. 95–95, 8 Dec. 2011.

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

MALLIANI, A. The pattern of sympathovagal balance explored in the frequency domain. **Physiology**, Rockville, v. 14, n. 3, p. 111–117, Jun. 1999.

MALLIANI, A.; MONTANO, N.; PAGANI, M. Physiological background of heart rate variability. **Cardiac Electrophysiology Review**, New York, v. 1, n. 3, p. 343–346, 1 Sep. 1997.

MARTELLI, D.; FARMER, D. G. S.; YAO, S. T. The splanchnic anti-inflammatory pathway: could it be the efferent arm of the inflammatory reflex? **Experimental Physiology**, Cambridge, v. 101, n. 10, p. 1245–1252, 1 Oct. 2016.

MOORE, K.; AGUR A.; DALLEY, A. Essential Clinical Anatomy (4th ed.). USA: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 356-357, 2010.

NICOLAU, C. *et al.* Effect of internal carotid artery occlusion on vertebral artery blood flow: a duplex ultrasonographic evaluation. **Journal of Ultrasound in Medicine**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 105–111, Feb. 2001.

NIIJIMA, A. *et al.* The effects of interleukin-1/3 on the activity of adrenal, splenic and renal sympathetic nerves in the rat. **Journal of the Autonomics Nervous Systems**, Amsterdam, v. 36, p. 183-192, 1991.

OLIVEIRA, L. R. *et al.* Induction of chronic non-inflammatory widespread pain increases cardiac sympathetic modulation in rats. **Autonomic Neuroscience**, Amsterdam, v. 167, n. 1/2, p. 45–49, Apr. 2012.

OLIVEIRA, R. P. C. *et al.* Neurohumoral Mechanisms Involved in the Hypertensive Response Elicited by Bilateral Carotid Occlusion in Conscious Intact or Chronically Sympathectomized Rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 26, n. 6, p. 537–545, jan. 2004.

OOSTING, J.; STRUIJKER-BOUDIER, H. A. J.; JANSSEN, B. J. A. Validation of a continuous baroreceptor reflex sensitivity index calculated from spontaneous fluctuations of blood pressure and pulse interval in rats. **Journal of Hypertension**, London, v. 15, n. 4, p. 391–399, Apr. 1997.

OSTERZIEL, K. J. *et al.* Baroreflex sensitivity and cardiovascular mortality in patients with mild to moderate heart failure. **British heart journal**, v. 73, n. 6, p. 517–522, jun. 1995.

POLYCARPOU, A. *et al.* Adaptation of the cerebrocortical circulation to carotid artery occlusion involves blood flow redistribution between cortical regions and is independent of eNOS. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 311, n. 4, p. H972–H980, 1 Oct. 2016.

PORTA, A. *et al.* Assessment of cardiac autonomic modulation during graded head-up tilt by symbolic analysis of heart rate variability. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 293, n. 1, p. H702–H708, Jul. 2007a.

PORTA, A. *et al.* Entropy, entropy rate, and pattern classification as tools to typify complexity in short heart period variability series. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, New York, v. 48, n. 11, p. 1282–1291, Nov. 2001.

PORTA, A. *et al.* Progressive decrease of heart period variability entropy-based complexity during graded head-up tilt. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 4, p. 1143–1149, oct. 2007b.

RICHMAN, J. S.; MOORMAN, J. R. Physiological time-series analysis using approximate entropy and sample entropy. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 278, n. 6, p. H2039–H2049, 1 Jun. 2000.

RINCON SOLER, A. I. *et al.* The impact of artifact correction methods of RR series on heart rate variability parameters. **Journal of Applied Physiology**, v. 124, n. 3, p. 646–652, 1 mar. 2018.

ROWAIYE, O. O.; JANKOWSKA, E. A.; PONIKOWSKA, B. Baroreceptor sensitivity and diabetes mellitus. **Cardiology Journal**, v. 20, n. 5, p. 453–463, 2013.

SABALBAL, M.; JOHNSON, M.; MCALISTER, V. Absence of the genicular arterial anastomosis as generally depicted in textbooks. **The Annals of The Royal College of Surgeons of England**, v. 95, n. 6, p. 405–409, sep. 2013.

SANTOS-ALMEIDA, F. M. *et al.* Carotid sinus nerve electrical stimulation in conscious rats attenuates systemic inflammation via chemoreceptor activation. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, p. 6265, Dec. 2017.

SCHREIHOFER, A. M.; GUYENET, P. G. The baroreflex and beyond: control of sympathetic vasomotor tone by gabaergic neurons in the ventrolateral medulla. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 514–521, May 2002.

SHAFFER, F.; MCCRATY, R.; ZERR, C. L. A healthy heart is not a metronome: an integrative review of the heart's anatomy and heart rate variability. **Frontiers in Psychology**, v. 5, 30 sept. 2014.

SILVA, L. E. V. Sistemas não lineares e complexidade na análise da variabilidade da frequência cardíaca. **Revista Hipertensão**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 12-31, 2017.

SILVA, L. E. V. *et al.* Comparison between spectral analysis and symbolic dynamics for heart rate variability analysis in the rat. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, p. 8428, Dec. 2017.

SILVA, L. E. V. *et al.* Revisiting the sequence method for baroreflex analysis. **Frontiers in Neuroscience**, Lausanne, v. 13, p. 17, 23 Jan. 2019.

SILVA, L. E. V.; FAZAN, R.; MARIN-NETO, J. A. PyBioS: a freeware computer software for analysis of cardiovascular signals. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, Amsterdam, v. 197, p. 105718, Dec. 2020.

SINGH, J. P. *et al.* Reduced heart rate variability and new-onset hypertension. **Hypertension**, Hagerstown, v. 32, n. 2, p. 293–297, 1 Aug. 1998.

STAUSS, H. M. *et al.* Baroreceptor reflex sensitivity estimated by the sequence technique is reliable in rats. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 291, n. 1, p. H482–H483, Jul. 2006.

SUBHA, M. *et al.* Decreased baroreflex sensitivity is linked to sympathovagal imbalance, low-grade inflammation, and oxidative stress in pregnancy-induced hypertension. **Clinical and Experimental Hypertension**, New York, v. 38, n. 8, p. 666–672, 16 Nov. 2016.

TAKAGISHI, M. *et al.* IL-6 microinjected in the nucleus tractus solitarii attenuates cardiac baroreceptor reflex function in rats. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 298, n. 1, p. R183–R190, Jan. 2010.

TOBALDINI, E. *et al.* Symbolic analysis detects alterations of cardiac autonomic modulation in congestive heart failure rats. **Autonomic Neuroscience**, Amsterdam, v. 150, n. 1/2, p. 21–26, Oct. 2009.

TOBALDINI, E. *et al.* Heart rate variability in normal and pathological sleep. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 4, p. 1-11, 2013.

WEEKS, J. R.; JONES, J. A. Routine direct measurement of arterial pressure in unanesthetized rats. **Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 104, n. 4, p. 646–648, 1 Aug. 1960.

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**, Piscataway, v. 15, n. 2, p. 70–73, 1967.

ZUCKER I.H.; GILMORE J.P. Reflex control of the circulation. **CRC Press**, Boston, 1991.