

Guilherme da Cunha Messias dos Santos

**CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DOS POTENCIAIS EVOCADOS NO
NERVO DEPRESSOR AÓRTICO REVELA *CLUSTERS* DE ATIVIDADE
DE BARORRECEPTORES DURANTE VARIAÇÕES AGUDAS DE
PRESSÃO ARTERIAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes

Co-Orientadora: Prof. Dra. Andréa Siqueira Haibara

Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Janeiro de 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Este trabalho foi realizado no Núcleo de Neurociências do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio Financeiro: CNPq; CAPES; FAPEMIG

DEDICATÓRIA

Ao meu Pai,
Arnaldo Gomes do Santos
"In memoriam"

À minha Mãe,
Eliana da Cunha Messias dos Santos

Aos meus Irmãos,
Felipe e Isabela

À minha Família,
Andréa e Victor

AGRADECIMENTOS

Aos amigos do NNC pelo apoio
e ao Prof. Márcio Moraes pela orientação, amizade e incentivo.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG
por terem viabilizado a execução deste trabalho.

“Eu quase nada sei, mas
desconfio de muita coisa”
(João Guimarães Rosa)

RESUMO

O controle neural do sistema cardiovascular envolve a ativação de sensores periféricos, os quais através de suas aferências estimulam porções específicas do sistema nervoso central. Dentre esses sensores podemos citar os barorreceptores arteriais, que são formados pelo sistema carotídeo e aórtico (barorreceptores aórticos (aBR)). As informações sensoriais dos aBR têm acesso ao sistema nervoso central através do nervo depressor aórtico (ADN). Como outros nervos sensoriais, o ADN é formado por duas classes distintas de fibras (tipo A e tipo C) com propriedades eletrofisiológicas distintas. Estudos vêm mostrando que existe um recrutamento diferencial dessas fibras durante estimulação elétrica do ADN e que esse recrutamento tem implicações diretas na codificação central da pressão arterial (PA). Nossa hipótese é que existem classes funcionais de aBR eletrofisiologicamente detectáveis que operam em faixas específicas de PA. Os potenciais evocados (ERP) do ADN apresentam dinâmica não-estacionária, isto é, exibem variações no formato de onda, na relação sinal/ruído e na latência dos picos. A carência de trabalhos na literatura dedicados ao estudo de ERP não-estacionários pode ser em parte explicada pela dificuldade de se correlacionar esse tipo de fenômeno elétrico com uma variável fisiológica de interesse. Nesse caso, técnicas classicamente usadas (p.e promediação) não são indicadas sem antes utilizar métodos que minimizem a não-estacionariedade do sinal. O ADN esquerdo de ratos Wistar machos (n = 8) foi isolado cirurgicamente e posicionado sobre um eletrodo de com dois pares de registros diferenciais. As artérias femorais esquerda e direita foram canuladas para registro e variações agudas de PA, respectivamente, via hemorragia e reinfusão controladas. Os sinais do ADN foram gatilhados e janelados (120ms a partir do pico da PA pulsátil) e apenas os ERP do primeiro par de

eletrodos foram submetidos a algoritmos iterativos desenvolvidos em MATLAB® para correção de variações de fase (Método Woody, 1967). Essa correção foi baseada na correlação cruzada entre cada janela de gatilho de ADN com a média da iteração. Para possibilitar o cálculo das velocidades de condução dos disparos do ADN, era crucial garantir que as relações temporais entre os disparos correspondentes do primeiro par e do segundo par de eletrodos fossem mantidas. Para corrigir então os erros de latência dos ERP do ADN do segundo par utilizamos a matriz de erros de latência dos ERP do primeiro par de eletrodos. Os ERP com variações de fase corrigidas, de ambos os pares de eletrodos, foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) para redução dimensional. As três primeiras componentes principais continham 95% da variância do sinal e foram submetidas à clusterização não-supervisionada. Os valores correspondentes de pressão arterial média (PAM) para cada clusters de ERP foram C1: 100.5mmHg \pm 14.80; C2: 95.80 mmHg \pm 13.58; C3: 91.93mmHg \pm 14.46; C4: 84.10 mmHg \pm 16.85; C5: 72.02mmHg \pm 14.32; C6: 55.12mmHg \pm 13.08; C7: 38.34 mmHg \pm 8.832 (One-Way ANOVA C4 – C7 $p < 0.001$; C1 – C3 $p > 0.05$; $n=8$). Não detectamos a presença de histerese entre a PAM dos períodos de hemorragia e reinfusão de sangue ($n = 8$, Two-Way ANOVA $p = 0.15$). Neste trabalho foi possível: (1) estabelecer uma correlação entre ERP não-estacionários do ADN com uma variável fisiológica de interesse (PA); (2) determinar a atividade específica desses potenciais em clusters funcionais eletrofisiologicamente detectáveis, além de calcular a velocidade de condução dos disparos do ADN.

ABSTRACT

The neural control of the cardiovascular system is accomplished by activation of peripheral sensors that stimulate specific portions of the central nervous system. One of the most important cardiovascular modulatory systems is the aortic baroreceptors (aBR). The aBR are stretch receptors located within the aortic arch that send electrical signals to the brainstem via the aortic depressor nerve (ADN). Like other sensory nerves, the ADN consists of two distinct classes of fibers (type A and type C) with characteristic electrophysiological properties. Studies have shown that there is a differential recruitment of these fibers during electrical stimulation of the ADN and that recruitment has direct implications for the central codification of arterial pressure (AP). Our hypothesis is that there are functional classes of aBR that are electrophysiologically detectable and that operate within specific bins of AP. The event related potentials (ERP) of ADN exhibits non-stationary dynamics, that is, there are phase shifts (latency shifts), wave morphology variations and different signal-to-noise ratio (SNR) across trials. The lack of studies in literature devoted to the understanding of non-stationary ERP can be partly explained by the difficulty to correlate this type of electrical phenomenon with a physiological variable. In such cases averaging is not advisable without first some kind of phase correction signal processing that minimizes the phase shifts (non-stationarity behaviour). The left ADN of male Wistar rats ($n = 8$) was isolated surgically and placed over an electrode. The left and right femoral arteries were cannulated to, respectively, record pulsatile AP and to cause acute changes in AP, via controlled bleeding and blood reinfusion. Only the ADN signals of the first pair of electrodes were triggered with the peak of the AP (windows of 120 ms) and submitted to an iterative algorithm for latency shift corrections (Woody, 1967). The latency variations of the ADN ERP of the second pair

of electrodes were correct based on the matrix containing the latency variations of the first pair. This was done to preserve the original temporal profile of the ADN ERP between the first pair of electrodes and the second, thus permitting calculate the conduction velocities of the ERP waves. This correction was estimated from the lag at which the cross-correlation value between each ADN ERP and the mean ADN ERP of the corresponding iteration was highest. The latency corrected ADN epochs of the two pairs of electrodes were then submitted to dimensional reduction, namely the principal component analysis (PCA). The first three principal components were used in an unsupervised clustering algorithm. For overall mean arterial pressure (MAP) period variations, seven clusters of ADN ERP were found: C1: 100.5mmHg \pm 14.80; C2: 95.80 mmHg \pm 13.58; C3: 91.93mmHg \pm 14.46; C4: 84.10 mmHg \pm 16.85; C5: 72.02mmHg \pm 14.32; C6: 55.12mmHg \pm 13.08; C7: 38.34 mmHg \pm 8.832 (One-Way ANOVA C4 – C7 $p < 0.001$; C1 – C3; $p = 0.15$; $n=8$). A tendency of a hysteresis dynamics between the MAP of the hemorrhagy and blood reinfusion periods was observable, although a statistical significance was not found ($n = 8$, Two-Way ANOVA $p = 0.15$). In the present work it was possible to (1) establish a direct correlation between the non-stationary ADN ERP and a physiological variable (AP); (2) determine the ERP activity within specific AP bins and calculate the conduction velocities of the ADN ERP waves.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN – Nervo Depressor Aórtico

CVLM – Bulbo Ventrolateral Caudal

ERJ – Jitter de Resposta Evocada (*Event Related Jitter*)

ERP – Potencial Evocado por Evento (*Event Related Potential*)

FA – Frequência de Amostragem

FCC – Função de Correlação Cruzada

i.p – Intraperitoneal

LTP – Long Term Potentiation

NTS – Núcleo do Trato Solitário

PA – Pressão Arterial

PAM – Pressão Arterial Média

PC – Componentes Principais

PCA – Análise de Componentes Principais

PE – Potenciais Evocados

RVLM – Bulbo Ventrolateral Rostral

SNC – Sistema Nervoso Central

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – SECÇÃO TRANSVERSAL DO ADN DE UM RATO WISTAR. (FAZAN, VPS, 2006)..	20
FIGURA 2 – DETALHE DO ELETRODO DE REGISTRO DO ADN. CONECTORES E FIOS NÃO MOSTRADOS	30
FIGURA 3 – CERVICOTOMIA VENTRAL PARA ISOLAMENTO DO ADN	31
FIGURA 4 – ISOLAMENTO DO ADN PRÓXIMO À ARTÉRIA CARÓTIDA COMUM E NERVO VAGO	32
FIGURA 5 – MÓDULOS DE CONTROLE DO SOFTWARE KANANDA®. A - CANAL DE REGISTRO DO ADN DO PRIMEIRO PAR DE ELETRODOS; B - CANAL DE REGISTRO DO ADN DO SEGUNDO PAR DE ELETRODOS; C – CANAL DE PA; D – JANELA DE PROCESSAMENTO ONLINE. ESSA JANELA FOI PROGRAMADA PARA PLOTAR OS EVENTOS DO PRIMEIRO CANAL DO NERVO GATILHADOS COM O PICO DA ONDA DE PA PULSÁTIL (DADO POR UM LIMAR DE GATILHO) EM UMA JANELA DE 120 MS; E - MÓDULO DE CONTROLE DOS CANAIS (ESCALAS, PROMEDIAÇÃO, GATILHO, ETC); F – MÓDULO DE CONTROLE DO CYBERAMP380-AXON INSTRUMENTS, ONDE SÃO CONTROLADOS OS FILTROS E GANHOS DE CADA CANAL.....	34
FIGURA 6 - REGISTRO CONTÍNUO DE PA DURANTE PERÍODO CONTROLADO DE HEMORRAGIA E REINFUSÃO DE SANGUE. DURANTE TODO O PERÍODO ERA FEITA A AQUISIÇÃO SIMULTÂNEA DOS ERP DO ADN.....	38
FIGURA 7 - REGISTRO TÍPICO DO ADN (TRAÇADOS INFERIORES) EM DIFERENTES NÍVEIS DE PA (TRAÇADOS SUPERIORES) DURANTE PERÍODOS DE HEMORRAGIA E DE REINFUSÃO CONTROLADOS.	39
FIGURA 8 – DINÂMICA DE CORREÇÃO DAS VARIAÇÕES DE FASE DOS ERP DO ADN, ADQUIRIDOS NO PERÍODO CORRESPONDENTE AO DA FIGURA 1, PELO ALGORITMO DE WOODY. NESSE CASO, A CORREÇÃO ESTABILIZOU-SE (ZERO) COM 20 ITERAÇÕES.	40

FIGURA 9 – DINÂMICA DE ESTABILIZAÇÃO DO COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO MÉDIO DE CADA ITERAÇÃO. NOTE QUE A ESTABILIZAÇÃO MÁXIMA DOS COEFICIENTES OCORREU POR VOLTA DA VIGÉSIMA ITERAÇÃO, O QUE CORRESPONDE AO QUE É MOSTRADO NA FIGURA ANTERIOR. ...41

FIGURA 10 – MÉDIA DOS ERP DO ADN DO PRIMEIRO PAR DE ELETRODOS ANTES (A E C) E DEPOIS (B E D) DA CORREÇÃO DE VARIAÇÕES DE FASE PELO MÉTODO WOODY DE UM MESMO RATO. FIGURAS SUPERIORES REPRESENTAM MÉDIA DE 905 ONDAS DO NERVO EM PAM BASAL (105 MMHG) E INFERIORES REPRESENTAM MÉDIA DE 411 ONDAS DO NERVO DURANTE DOIS PERÍODOS DE HEMORRAGIA (PAM VARIOU DE 105 MMHG ATÉ 15.5 MMHG).43

FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO VISUAL DAS TRÊS PRIMEIRAS COMPONENTES PRINCIPAIS DOS DISPAROS CAPTADOS PELO PRIMEIRO PAR DE ELETRODOS OCORRIDOS NO PERÍODO DE VARIAÇÃO DE PA DA FIGURA 1. UMA MATRIZ CONTENDO EM CADA COLUNA UM FORMATO DE ONDA DO ADN É SUBMETIDA AO PCA. NESSE GRÁFICO, CADA EIXO É UMA DAS TRÊS PRIMEIRAS COMPONENTES PRINCIPAIS E CADA PONTO REPRESENTA UM DISPARO DO ADN. AS TRÊS PRIMEIRAS COMPONENTES PRINCIPAIS CONTÊM MAIS DE 95% DA VARIÂNCIA DA MATRIZ ORIGINAL. UTILIZAMOS ESSAS COMPONENTES NO ALGORITMO DE CLASSIFICAÇÃO NÃO SUPERVISIONADO (KLUSTAWIN – VER APÊNDICE).....45

FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO DAS MESMAS COMPONENTES DA FIGURA ANTERIOR APÓS A APLICAÇÃO DO ALGORITMO DE CLASSIFICAÇÃO. NOTE QUE O ALGORITMO DETECTOU A EXISTÊNCIA DE 6 CLUSTERS (SENDO QUE 1 É RUÍDO: COR VERMELHA) DE DISPAROS DO ADN.46

FIGURA 13 – REGISTRO CONTÍNUO DE PA DE OUTRO RATO, ANÁLOGO À FIGURA 1. NOTE A PRESENÇA DE PERÍODOS DE HEMORRAGIA E REINFUSÃO DE SANGUE. REALIZOU-SE SEGUIDAMENTE A ANÁLISE DE CORREÇÃO DE VARIAÇÕES DE FASE, PCA E CLUSTERIZAÇÃO, NESSA ORDEM, GERANDO A FIGURA SEGUINTE.47

FIGURA 14 – REGISTRO CONTÍNUO DE PA DO MESMO RATO DA FIGURA ANTERIOR. REALIZOU-SE SEGUIDAMENTE A ANÁLISE DE CORREÇÃO DE VARIAÇÕES DE FASE, PCA E CLUSTERIZAÇÃO, NESSA ORDEM. CADA COR REPRESENTA UM CLUSTER DE ATIVIDADE DO ADN.....48

FIGURA 15 – SEPARAÇÃO DOS CLUSTERS DE ATIVIDADE DO ERP DO ADN POR PAM - C1: 100.5MMHG ± 14.80; C2: 95.80 MMHG ± 13.58; C3: 91.93MMHG ± 14.46; C4: 84.10 MMHG ± 16.85; C5: 72.02MMHG ± 14.32; C6: 55.12MMHG ± 13.08; C7: 38.34 MMHG ± 8.832 (ONE-WAY ANOVA * P < 0.001; # P > 0.05; N = 8.).....49

FIGURA 16 – SEPARAÇÃO DOS CLUSTERS DE ATIVIDADE DO ERP DO ADN POR PAM DURANTE LOOP DE HEMORRAGIA E REINFUSÃO DE SANGUE. APESAR DE NÃO EXISTIR DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA ENTRE OS CLUSTERS NOS DOIS PERÍODOS, PODE-SE NOTAR UMA TENDÊNCIA À HISTERESE. (N = 8, TWO-WAY ANOVA P = 0.15).....50

FIGURA 17 – AS FIGURAS REPRESENTAM O ERP MÉDIO DE CADA CLUSTER, PARA OS REGISTROS DO PRIMEIRO PAR DE ELETRODOS (ADN1 EM VERMELHO) E PARA O SEGUNDO PAR (ADN2 EM AZUL). NOTE A DEFASAGEM PRESENTE ENTRE AS ONDAS. O GRÁFICO DE BARRAS REPRESENTA A ENERGIA MÉDIA DE CADA CLUSTER PARA O ADN1. ESSES GRÁFICOS CORRESPONDEM A UM PERÍODO DE HEMORRAGIA DE UM RATO: C1: 103.6 ± 04.2 MMHG / MÉDIA DE 48 ONDAS; C2: 87.91 ± 09.50 MMHG / MÉDIA DE 134 ONDAS; C3: 69.4 ± 9.32 MMHG / MÉDIA DE 61 ONDAS; C4: 41.67 ± 10.31 MMHG / MÉDIA DE 145 ONDAS. VALORES DE PAM EXPRESSOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO.53

FIGURA 18 – ERP CORRESPONDENTE AO CLUSTER 1 DO PRIMEIRO PAR DE ELETRODOS (EM VERMELHO) E DO SEGUNDO PAR (EM AZUL), OS MESMOS DA FIGURA ANTERIOR. NOTE A PRESENÇA DE DEFASAGEM ENTRE OS PICOS. SABENDO-SE QUE A DISTÂNCIA ENTRE OS PARES DE ELETRODO É DE 1MM, FOI POSSÍVEL CALCULAR A VELOCIDADE DE CONDUÇÃO PARA OS PARES DE ONDAS COMO MOSTRA A FIGURA.....55

FIGURA 19 – CLUSTERS C1: 103.60 ± 4.2 MMHG / MÉDIA DE 48 ONDAS E C3: 69.4 ± 9.30 MMHG / MÉDIA DE 61 ONDAS (OS MESMOS DA FIGURA 17) SOMENTE PARA O PRIMEIRO PAR DE ELETRODOS EM JANELA TEMPORAL MENOR (12 MS) PARA MOSTRAR LATÊNCIAS E AMPLITUDES DOS DISPAROS DO NERVO. NOTE A PRESENÇA DOS MESMOS VALES (SETAS COM VALORES DE LATÊNCIA FIXOS) NOS DOIS CLUSTERS E O SURGIMENTO DE NOVOS, DE CURTA LATÊNCIA, (SETAS COM SÍMBOLO #) EM C1.....56

FIGURA 20 – MÉTODO DE FUNCIONAMENTO DO ALGORITMO DE CORREÇÃO DE VARIAÇÕES DE FASE (WOODY, 1967)67

FIGURA 21 – MÉTODO DE FUNCIONAMENTO DO ALGORITMO K-MEANS DE CLUSTERIZAÇÃO.72

CONTEÚDO

Apoio Financeiro: CNPq; CAPES; FAPEMIG	2
DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	11
CAPÍTULO 1	17
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Os Barorreceptores Arteriais	17
1.2. Potenciais Evocados	23
CAPÍTULO 2	28
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivos Gerais	28
2.2. Objetivos Específicos	28
CAPÍTULO 3	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Animais	29
3.2. Confeção dos Eletrodos de Registro do ADN	29
3.3. Cirurgias	30
3.3.1. <i>Cirurgia de Isolamento do ADN</i>	30
3.3.2. <i>Cirurgia de Canulação das Artérias Femorais</i>	32
3.4. Registros Eletrofisiológicos	33
3.4.1. <i>Sistema de Registro</i>	33
3.4.2. <i>Registro da Atividade Elétrica do ADN</i>	33

3.4.3. Registro de PA.....	34
3.5. Processamento e Análise dos Dados.....	35
CAPÍTULO 4	38
4. RESULTADOS	38
4.1. Registro de PA e do ADN.....	38
4.2. Correção de Variações de Fase pela Técnica de Woody	40
4.1. Realização da PCA e da Técnica de Clusterização	44
CAPÍTULO 5	57
5. DISCUSSÃO	57
CAPÍTULO 6	65
6. CONCLUSÕES	65
7. APÊNDICE	66
7.1. Método Woody e Função de Correlação Cruzada	67
7.2. Análise de Componentes Principais.....	69
7.3. Clusterização Não-Supervisionada	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
9. CERTIFICAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL ...	82

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os Barorreceptores Arteriais

O controle neural do sistema cardiovascular envolve a ativação de sensores periféricos, os quais através de suas aferências estimulam porções específicas do sistema nervoso central (SNC). Essas áreas são capazes de promover alterações na atividade respiratória e na liberação de hormônios [1, 2], bem como modular a atividade autonômica eferente [3, 4]. Dentre esses sistemas sensoriais periféricos podemos destacar os barorreceptores arteriais. Os barorreceptores são terminações nervosas livres, densamente ramificadas, localizadas primordialmente nas paredes do arco aórtico e do seio carotídeo, distribuindo-se pela camada adventícia da parede vascular, onde se ancoram fortemente aos demais constituintes do vaso [5]. São, portanto, mecanorreceptores sensíveis à deformação determinada pelas ondas de pulso de pressão arterial (PA).

As informações sensoriais dos barorreceptores têm acesso ao SNC através do nervo depressor aórtico (ADN) (aferências do arco aórtico) e do nervo do seio carotídeo (aferências do seio carotídeo). O ADN foi descrito em 1866, pelos pesquisadores alemães Cyon e Ludwig [6] e foi denominado depressor porque, após sua estimulação elétrica, observou-se queda da PA e redução da frequência cardíaca.

Baseado em estudos da década de 70 e 80 [7, 8] tornou-se quase consenso na literatura a presença de apenas aferências barorreceptoras e não quimiorreceptoras no ADN em ratos. Entretanto, algumas evidências anatômicas em ratos Wistar [9-11], sugerem a presença de quimiorreceptores no arco aórtico,

enquanto outro estudo utilizando eletrofisiologia [12] demonstrou a presença de aferências quimiorreceptoras funcionantes no ADN em ratos Sprague–Dawley. Para investigar essa questão, um extenso estudo [13] utilizando ratos Wistar e Sprague–Dawley foi realizado. Entretanto, em nenhuma dessas linhagens, foi encontrada atividade quimiorreceptora no ADN durante hipóxia e hipercapnia, ao contrário do nervo do seio carotídeo. Diversos estudos reafirmam que a estimulação do ADN (seja endógena por PA ou elétrica) produz apenas ativação barorreceptora em ratos Wistar [14-16]. Portanto, considera-se o ADN como uma oportunidade ímpar para o estudo dos barorreceptores aórticos e seu papel na regulação da PA nesses animais.

Os barorreceptores são classicamente considerados como os principais responsáveis pela regulação rápida da pressão arterial (PA) [17-22]. Diversos estudos utilizando técnicas morfométricas, farmacológicas e eletrofisiológicas mostram que o sítio de projeção dessas aferências encontra-se no núcleo do trato solitário (NTS), considerado a primeira estação sináptica da via do barorreflexo [23-27]. Em última análise, os barorreceptores atuam no sentido de manter de forma estável a perfusão cerebral e de outros órgãos, por meio da correção batimento a batimento da PA [28]. A regulação rápida dos barorreceptores, independentemente do novo nível da pressão, deve-se ao fato de que esse reflexo age como um sistema “tampão” eficaz contra flutuações de PA. Variações nos níveis pressóricos sistêmicos levam a alterações na atividade elétrica das fibras aferentes barorreceptoras que, por sua vez transmitem essa sinalização a diversos núcleos do SNC (bulbo ventrolateral: rostral: RVLM e bulbo ventrolateral caudal: CVLM, principalmente), gatilhando ajustes no sistema. A atividade dos barorreceptores sobre os centros vasomotores do tronco cerebral ocorre de forma tônica inibitória.

Uma diminuição na PA remove esse estímulo inibitório, por meio de uma diminuição da frequência de disparo aferente, resultando em aumento do tônus simpático e em diminuição do tônus parassimpático. Compressões do ADN de diversas naturezas, processos degenerativos, alterações na parede vascular onde se inserem os barorreceptores ou mesmo em suas projeções centrais podem levar a situações potenciais de falha desse sistema [29], com um grande espectro de manifestações clínicas. Especial atenção tem sido dada às alterações clínicas e fisiopatológicas do barorreflexo em humanos com morbidades de alta prevalência, como *diabetes mellitus* [30, 31] e hipertensão arterial sistêmica [29, 32], bem como em modelos experimentais dessas doenças [5, 33-38].

Como outros nervos sensoriais, o ADN é formado por duas classes distintas de fibras (Fig1): (1) Mielínicas Tipo A e (2) Amielínicas Tipo C, ambas com propriedades eletrofisiológicas características (velocidades de condução, limiar de ativação e frequência de disparo) [39-41]. Estudos com estimulação elétrica do ADN em ratos mostraram que as fibras-A possuem baixo limiar de ativação e parecem codificar PA com maior fidelidade do que fibras-C. Em contrapartida, fibras-C possuem alto limiar de ativação e apresentam disparos esparsos e variáveis, com baixa fidelidade de codificação [40, 42-44]. Essas diferenças suportam a idéia de que as fibras-A são primariamente importantes em valores basais ou menores de PA, enquanto as fibras-C são cruciais em níveis pressóricos maiores que o normal.

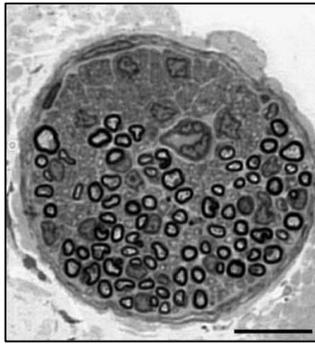


Figura 1 – Secção transversal do ADN de um rato Wistar. (Fazan, VPS, 2006)

Barra de escala corresponde a 10 micrômetros.

Um estudo recente [45] demonstrou que a estimulação elétrica do ADN com baixa amplitude e intensidade recruta essencialmente fibras-A, enquanto um estímulo tetanizante (alta frequência e amplitude) foi capaz de ativar fibras-C e gerar grandes respostas depressoras. Além disso, esse estímulo foi capaz de potencializar, por algumas horas, o ganho das fibras-A. Isso foi comprovado por registros unitários no NTS, em que neurônios barorreceptores apresentaram potenciação de seus disparos. Podemos traçar um paralelo entre estados hipertensivos transitórios ou persistentes com o estímulo elétrico tetanizante, em que o recrutamento de fibras-C ocorre de forma ampla, apesar da natureza do estímulo (PA versus Elétrico) ser totalmente diferente. Nesse mesmo estudo, o uso de um bloqueador de transmissão glutamatérgica foi capaz de abolir essa potenciação. Comprovou-se então, pela primeira vez, a existência de um fenômeno glutamato-dependente chamado de potenciação de longo prazo (LTP) em áreas barorreceptoras do NTS. Apesar das fibras-C exibirem disparos irregulares se comparadas com as fibras-A, elas possuem efeitos cardiovasculares muito mais pronunciados. Thoren e colaboradores [44] demonstraram que o bloqueio anodal da ativação das fibras-A levou a significativa diminuição da sensibilidade

barorreceptora, sem flutuações dos níveis basais de PA. O bloqueio das fibras-C, no entanto, foi capaz de elevar significativamente esses níveis, indicando a perda da inibição tônica simpática. Na mesma publicação Thoren et al mostraram ainda que a atividade das fibras-C não sofreu mudanças quando se variava o diâmetro da aorta. Algumas hipóteses foram formuladas para explicar as diferenças entre os tipos de fibras do ADN. Segundo os autores a atividade barorreceptora estaria determinada não pela deformação global do vaso, mas sim pelas propriedades elásticas intrínsecas do tecido onde as terminações barorreceptoras estão inseridas. Uma das hipóteses é a de que fibras tipo-A são sensores de dilatação ou de diâmetro da aorta, pois estariam dispostas em paralelo com as fibras colágenas altamente distensíveis, sendo recrutadas em pressões relativamente baixas. Isso explicaria o baixo limiar de ativação e a saturação da atividade dessas fibras em pressões mais altas, quando os filamentos de elastina já estariam tensos. Em contrapartida, as fibras-C estariam acopladas em série com o colágeno da adventícia, a qual sofre estiramento somente em valores de PA muito altos. Isso explicaria o alto limiar de ativação dessas fibras. Basicamente, segundo Thoren et al [44], as fibras-A responderiam a mudanças no diâmetro, enquanto as fibras-C responderiam à diminuição na espessura da parede da aorta, quando o diâmetro máximo foi atingido.

Registros multiunitários realizados em NTS foram capazes de determinar como a integração da atividade aferente barorreceptora ocorre em nível central [46]. Os autores demonstraram que processos de inibição tempo-dependente ocorrem no NTS, e dessa forma, padrões de disparo aferente de fibras tipo A e C são fundamentais para a sinalização de neurônios barorreceptores de primeira e segunda ordem nesse núcleo, com implicações diretas na regulação da PA.

Estudos pioneiros da década de 70 em coelhos [47], cães [48] e ratos [49] confirmaram a presença de atividade diferencial do ADN em curvas de pressão com variação pressórica bidirecional (diminuição a aumento da PA). Eles mostraram que em uma dada pressão, a atividade do ADN é maior quando a pressão está aumentando do que quando está diminuindo, configurando uma curva clássica de histerese. Outro estudo realizou registros unitários de fibras do ADN em coelhos anestesiados e acordados durante variação de PA por meio de um balão inflável perivascular. Eles demonstraram um padrão clássico de histerese na resposta do nervo desta forma variações na frequência cardíaca são dependentes não somente dos níveis absolutos de PAM, mas também da direção em que a sua variação ocorre [50]

Apesar da vasta literatura sobre a estrutura e função dos barorreceptores aórticos em diferentes níveis de organização, poucos estudos abordam como se estabelece a dinâmica periférica de ativação do ADN durante variações agudas de PA. De acordo com o que foi dito anteriormente e já demonstrado na literatura, padrões de atividade do ADN têm papel importante na gênese de informações sensoriais para o NTS com implicações diretas para a sinalização e codificação pressórica central.

Nossa hipótese é que existem padrões de atividade do ADN, eletrofisiologicamente detectáveis, que disparam preferencialmente em faixas de PA específicas. Cabe ressaltar a importância de usar como estímulo a própria PA, pois a via do barorreflexo responde natural e fisiologicamente a esta variável fisiológica. O recrutamento do ADN durante pulsos de estimulação elétrica ocorre de forma totalmente diferente, não sendo apropriada para testar nossa hipótese.

Para investigarmos essa questão, utilizaremos a técnica de registro de potenciais evocados no ADN aliada a técnicas de análise e processamento de sinais, como discutiremos abaixo.

1.2. Potenciais Evocados

Um dos grandes desafios das Neurociências atualmente é observar as interações entre grupos neurais para entender como o processo organizacional da função/disfunção desses substratos é dinamicamente estabelecido. Dentre as ferramentas que permitem um estudo da dinâmica de evolução da atividade neural, destacamos aquelas relacionadas à eletrofisiologia.

O uso de técnicas de registro de potenciais evocados relacionados a um evento (ERP - *Event Related Potential*) específico tem apresentado grande avanço em neurociências recentemente. Podemos considerar como um ERP toda resposta de substratos ou redes neurais evocada por estimulação sensorial, elétrica ou até mesmo por atividade periódica endógena. Uma vertente de trabalhos na literatura considera os ERP como eventos com amplitude definida, independentes da atividade de fundo e estacionários no tempo, isto é, não há mudança na morfologia básica do sinal. [51-55].

Apesar do modelo estacionário de ERP, até o momento, não há consenso de que eles possuam latência e amplitude fixas (David et al., 2005; Du"zel et al., 2005; Fuentesmilla et al., 2006; Gruber et al., 2005; Hamada, 2005; Hanslmayr et al., 2007; Mazaheri and Picton, 2005; Mazaheri and Jensen, 2006; Naruse et al., 2006).

Variações na latência das fases dos ERP podem ocorrer fisiologicamente ou em decorrência do uso de gatilhos variáveis, como são os gatilhos biológicos ou mesmo por vícios de amostragem. Essas variações, chamadas de *jitter* (utilizaremos nesse trabalho o termo *variações de fase ou variações de latência*), são eventos

caóticos ou estocásticos que causam diminuição da amplitude do sinal registrado durante técnicas de promediação (Souders et al., 1990). Podemos de forma geral, considerar a existência de dois tipos de variações de fase: (1) as variações fisiológicas e (2) as variações físicas. Há evidências de que o primeiro grupo seja resultado de mudanças rápidas (escala de milissegundos) no padrão de conexão de populações neurais de redes dinamicamente acopladas ou mesmo da presença de múltiplos geradores implicados na gênese dos ERP. A presença de variações de fase já foi demonstrada em ERP somatosensoriais [56], visuais [57] e durante estimulação magnética transcraniana [58], além de outras modalidades sensoriais.

Alguns autores [59, 60] mostram que dependendo do grau de atenção seletiva do indivíduo durante registros de ERP corticais, há significativas variações de amplitude dos ERP entre os trials, além da presença de variações de fase.

Devido a essas implicações, as variações fisiológicas ganharam destaque como um fenômeno associado a processos de integração neural no SNC durante tarefas cognitivas [61-63]. Além disso, a estimação dessas variações (Jitter de resposta evocada - ERJ) vem sendo usada como ferramenta auxiliar no diagnóstico de doenças mentais [64] e neuromusculares [65].

A segunda classe de variações de fase é aquela relacionada a erros de estimação de amostragem de sinais ou em decorrência do uso de triggers variáveis, que é o nosso caso. A PA é um sinal biológico e inerentemente à sua natureza, apresenta dinâmica temporal variável. Portanto, nas mesmas janelas de trigger referenciadas nos sinais de ADN, há significativas variações na latência das fases das ondas que compõe esse sinal. Classicamente, as técnicas de promediação no domínio do tempo são consideradas as estratégias mais comuns para se extrair informação de ERP. Na década de 50, a sobreposição manual de traçados [66, 67]

não permitia, na prática, o uso de mais de 10-20 registros devido a fatores associados à transparência das folhas de impressão. Com o advento da digitalização de sinais, o “modelo aditivo”, como foi chamado, pode ser implementado com grande sucesso. A técnica de promediação assume que cada ERP é composto por uma combinação linear do ruído de fundo e dos eventos gatilhados pelo estímulo, possuindo ainda latências e amplitudes bem definidas. Dessa forma, durante ou após a aquisição de várias ondas de potenciais evocados, onde o tempo inicial (t_0) está sincronizado com o estímulo gatilhador, realiza-se a média aritmética dos valores. Este processo “elimina”, na onda de ERP, qualquer potencial não relacionado ao gatilho.

A técnica de potenciais evocados pode ser usada para se estudar aspectos funcionais da via sensorial primária, permitindo uma análise temporal da evolução do sinal ao longo dos substratos neurais que compõem esta via [68]. Além da alta resolução temporal, outra característica importante dos potenciais evocados é sua reprodutibilidade, pois se pode efetuar o registro em vários pontos diferentes, não necessariamente no mesmo instante, e ainda assim referenciar os potenciais encontrados ao início do estímulo sensorial.

É bem sabido que a presença de artefatos como ruído, não-estacionaridade dos ERP e variações de fase de qualquer natureza introduzem um efeito indesejável de um filtro passa-baixa no sinal promediado. Esse efeito deve ser levado em conta quando sinais de alta frequência estão sendo analisados, caso contrário eles serão considerados como parte espúria do ERP durante a promediação. Dessa forma, a presença de variações de fase impossibilita a realização de promediação sem que antes haja técnicas que possibilitem sua correção.

Uma das técnicas mais amplamente utilizadas para estimação e correção de variações de fase com subsequente promediação de ERP, foi a descrita por Woody na década de 60 [69]. Nesse estudo, foi realizada uma promediação inicial de todos os ERP adquiridos durante o registro eletrofisiológico. Essa média foi considerada um padrão, a qual serviu de modelo para comparação, por meio da função de correlação cruzada (FCC) (ver apêndice), de todos os ERP registrados. O valor da variação de fase de cada ERP foi estimado na la tência onde ocorreu o máximo dessa função. Cada janela contendo os ERP foi então deslocada no tempo, exatamente no valor da variação de fase dado pelo máximo da FCC. Como a primeira média (padrão) foi obtida a partir de ERP com essas variações, os ERP agora corrigidos foram novamente promediados, com o objetivo de se obter uma nova média, teoricamente mais representativa do ERP. Essa média será agora o novo padrão, com o qual cada ERP anteriormente corrigido sofrerá novamente estimação de variações de fase por meio da FCC, como descrito acima. Finalmente, esse processo foi realizado inúmeras vezes, até o momento em que os ERP não apresentavam mais significativa diminuição de variações de fase em relação à média. Essa média (último padrão), por teoricamente não apresentar variações de fase, possuía a melhor relação sinal/ruído e era considerada como a onda resultante de todos os ERP promediados.

A dificuldade de desenvolvimento de protocolos experimentais para o estudo de ERP não-estacionários está intimamente associada às características eletrofisiológicas desses fenômenos como relação sinal/ruído e morfologia de onda variáveis entre os trials, além da presença de variações de fase. Isso justifica, dentre outras coisas, a carência de trabalhos na literatura dedicados aos estudo dos ERP não-estacionários.

Nesse trabalho utilizamos eletrofisiologia aliada a técnicas de análise e processamento digital de sinais para abordar os ERP não-estacionários do ADN e testar a hipótese da existência de padrões de atividade do ADN que operam em faixas específicas de PA.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

- Identificar e correlacionar padrões de atividade (*clusters ou agrupamentos*) dos potenciais evocados do ADN com a PAM

2.2. Objetivos Específicos

- Estudar os clusters dos ERP do ADN com relação à latência, amplitude (Energia), velocidade de condução e morfologia de onda.
- Desenvolver rotinas em MATLAB que executem correção de fase, FCC, PCA para análise dos registros do ADN, bem como de outros registros eletrofisiológicos realizados em nosso laboratório;
- Usar método de clusterização K-means não-supervisionado para agrupar padrões de disparos dos ERP do ADN;
- Testar a hipótese da presença de histerese entre os *clusters* dos ERP do ADN durante loops de hemorragia e reinfusão de sangue;

CAPÍTULO 3

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 350 e 400 gramas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO). Os animais são mantidos em um ciclo de 14 horas (6: 00 às 20:00) claro e 10 horas escuro, com livre acesso à água e à comida, a uma temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$. Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com Uretana 140 mg/100g, i.p. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) com o número 084/05. Cuidados foram tomados ao manusear os animais, sempre buscando usar o menor número possível dos mesmos, bem como evitar sofrimento desnecessário.

3.2. Confecção dos Eletrodos de Registro do ADN

Os eletrodos de registro da atividade do ADN foram construídos a partir de (1) tubos de sílica fundida, (2) fio de aço-inox recobertos por teflon (7916 A-M Systems), (3) acrílico sólido e moldável e (4) conectores Molex 3 Pinos. A partir de uma plataforma retangular de acrílico de aproximadamente 5mm largura por 5mm de comprimento, são acoplados três tubos de sílica. Esses tubos são introduzidos na plataforma fazendo um ângulo de 40° com a mesma e alinhados lado a lado com 1.0 mm de distância entre eles. Para isso foi usada uma mini-furadeira e um estereotáxico como guia para o processo de perfuração da plataforma de acrílico. Os fios usados para conectar o sistema de registro ao eletrodo são introduzidos em uma das extremidades dos tubos e soldados ao conector Molex, que por sua vez

está fixado à plataforma por cimento de zinco. A solda é recoberta com acrílico moldável para proteção contra possíveis danos externos. Na outra extremidade, são moldados pequenos ganchos a partir de fios de aço-inox (7916 A-M Systems), que irão acomodar o nervo (Fig 2). O eletrodo foi configurado dessa maneira (dois pares de registro diferencial) para que fosse possível calcular as velocidades de condução dos ERP do ADN. É importante ressaltar que a mesma configuração de conexão entre os cabos do eletrodo e o pré-amplificador foi mantida (pólo positivo e pólo negativo, veja figura 2), garantindo que a polaridade das ondas não foi modificada (ex: inversão de ondas entre os pares de eletrodos)

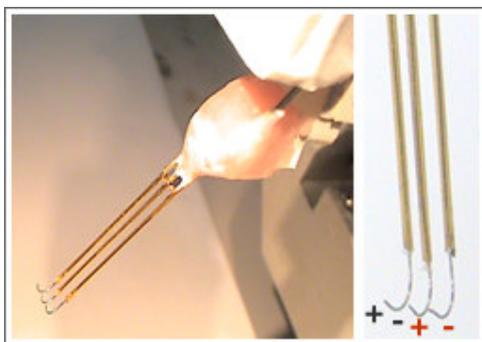


Figura 2 – Detalhe do Eletrodo de Registro do ADN. Conectores e Fios Não Mostrados

3.3. Cirurgias

3.3.1. Cirurgia de Isolamento do ADN

A cirurgia de isolamento do ADN é realizada em duas etapas, a saber:

- *Etapa macroscópica:* O animal, anestesiado e previamente tricotomizado na região ventral do pescoço, foi colocado em decúbito dorsal em um estereotáxico adaptado para esta cirurgia. Em seguida fizemos uma cervicotomia ventral de aproximadamente cinco centímetros com o objetivo de expor a camada superficial

de músculos e tecido adiposo local. Com o uso de pinças de metal delicadas, divulgamos essa camada recentemente exposta até atingir o segundo plano de músculos (Esternohióideo, Omohióideo, Esternomastóideo, principalmente). Com o auxílio de cotonetes de algodão, aplicamos a técnica de dissecação romba visando descolar os músculos acima citados, uns dos outros, e expor o feixe vículo-nervoso (Veia Jugular Interna, Artéria Carótida Comum, Nervo Vago e Nervo Simpático) circundado pela massa de músculos já dissecada. Usando afastadores de metal conectados a elásticos, esses músculos foram tracionados lateralmente prendendo o elástico à pinos de metal previamente fixados na mesa cirúrgica. Esse procedimento facilitou a visualização do feixe e da traquéia, localizada inferiormente ao músculo esternohióideo. O animal então foi entubado (traqueostomia) com tubo de polietileno flexível para melhor ventilação durante o restante do procedimento cirúrgico (Fig 3).

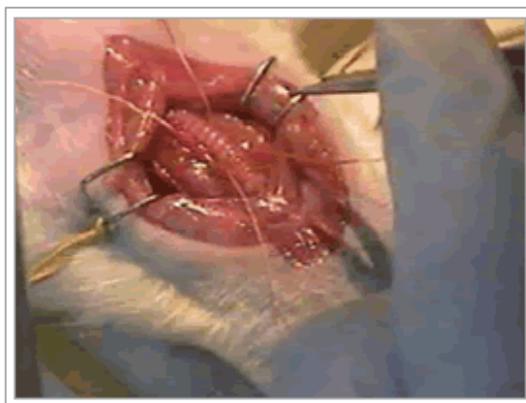


Figura 3 – Cervicotomia Ventral Para Isolamento do ADN

- *Etapa microscópica:* Com o auxílio de uma lupa cirúrgica, identificamos o feixe vículo-nervoso. Utilizando pinças especiais para microcirurgia (oftálmicas), fizemos a microdissecação dessa região. Para melhor visualização das estruturas, a veia

Jugular Interna foi isolada, envolvida por linha cirúrgica fina e levemente tracionada lateralmente. A linha é amarrada aos pinos de metal fixados na mesa cirúrgica onde está localizado o animal. A bainha do nervo vago foi aberta para a identificação do ADN. Identificado o nervo, inicia-se, de cranial para caudal, o isolamento do mesmo. Com o auxílio de uma linha mais fina que a usada no isolamento da Veia Jugular, o ADN foi dissecado, evitando-se tracioná-lo excessivamente. A linha foi usada para facilitar o manuseio do nervo na hora de posicioná-lo no eletrodo de registro, diminuindo as possibilidades de lesão de suas fibras (Fig 4). O nervo foi então posicionado no eletrodo de registro e registrado por alguns segundos para certificação de que se trata realmente do ADN (padrão de disparo característico. Ver figura 5).

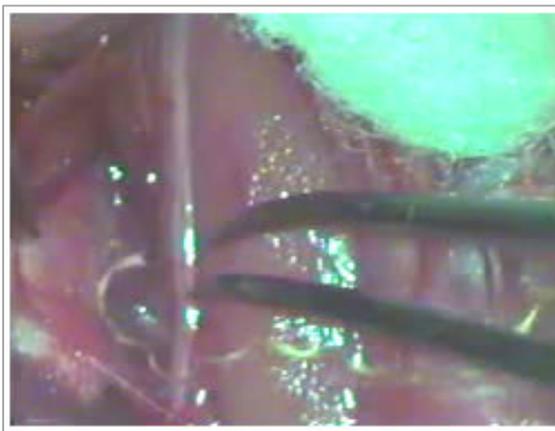


Figura 4 – Isolamento do ADN Próximo à Artéria Carótida Comum e Nervo Vago

3.3.2. Cirurgia de Canulação das Artérias Femorais

Após a certificação de que o ADN foi realmente isolado, por verificação eletrofisiológica, os animais foram submetidos à cirurgia de canulação das artérias femorais. As patas posteriores foram imobilizadas e realizada tricotomia femoral bilateral. Uma pequena incisão na pele foi feita e a musculatura local divulsionada

para visualização e dissecação do feixe vsculo-nervoso femoral. Após o isolamento das artérias femorais, a região proximal das cânulas (PE-10) foi introduzida e em seguida, o ponto de juno entre o PE-10 e o PE-50 foi fixado na região logo abaixo da inciso no vaso por meio de fios de sutura.

3.4. Registros Eletrofisiológicos

3.4.1. Sistema de Registro

A aquisio dos sinais bioelétricos foi realizada por um software desenvolvido no Núcleo de Neurociências (Kananda®), em linguagem C++. Os dados foram estocados em disco rígido para análise posterior. A figura 5 mostra a interface do software durante registro do ADN e de PA.

3.4.2. Registro da Atividade Elétrica do ADN

O registro foi realizado com o rato anestesiado em decúbito dorsal, em um aparelho estereotáxico (Kopfe Instruments) e dentro de uma gaiola de Faraday para evitar a contaminao por ruídos eletromagnéticos externos. O sinal bioelétrico da atividade do ADN foi enviado, via cabo, para o amplificador/filtro programável (CyberAmp380-Axon Instruments) onde foi filtrado (passa-baixa de 6KHz e passa-alta de 100Hz) e amplificado (ganho total de 50000x). Em seguida, também via cabo, o sinal foi enviado para o conversor analógico/digital 12 bits (NIDAQ 6023-E, National Instruments) onde foi amostrado a 25KHz em dois canais. Cada canal corresponde a um par de eletrodos conforme mostra a figura 2. Como cada par está separado por uma distância de 1mm, foi possível calcular a velocidade de conduo dos ERP do ADN.

3.4.3. Registro de PA

As artérias femorais esquerda e direita foram utilizadas para a mensuração e variação de PA durante o registro da atividade do ADN, respectivamente. O sinal de PA foi conduzido via cabo para o sistema de condicionamento de sinais, onde foi amplificado (ganho total de 1000x). Em seguida, também via cabo, o sinal foi enviado para o conversor analógico/digital 12 bits (NIDAQ 6023-E, National Instruments) onde foi amostrado a 25KHz.



Figura 5 – Módulos de Controle do Software Kananda®. A - Canal de registro do ADN do primeiro par de eletrodos; B - Canal de registro do ADN do segundo par de eletrodos; C – Canal de PA; D – Janela de Processamento online. Essa janela foi programada para plotar os eventos do primeiro canal do nervo gatilhados com o pico da onda de PA pulsátil (dado por um limiar de gatilho) em uma janela de 120 ms; E - Módulo de controle dos canais (escalas, promediação, gatilho, etc); F – Módulo de

Controle do CyberAmp380-Axon Instruments, onde são controlados os filtros e ganhos de cada canal.

3.5. Processamento e Análise dos Dados

Os arquivos contendo os 3 canais de registro (2 de ADN e 1 de PA) foram processados utilizando rotinas em C++ e MATLAB. Primeiro, as séries temporais foram gatilhadas com o ponto máximo de cada pulso de PA, a partir do qual recortamos janelas temporais de 120ms (20 ms antes e 100 ms depois do gatilho totalizando 3000 amostras) dos respectivos disparos do ADN nos dois pares do eletrodo.

Os dados foram organizados em uma matriz **M** com $w \times n$ elementos, onde w é o número de amostras de cada disparo (3000) e n é o número de disparos do ADN. O mesmo foi feito para o outro canal de ADN e para PA. Uma vez organizadas as matrizes, utilizamos a técnica de correção de variações de fase descrita por Woody (1969). Essa correção foi aplicada apenas aos ERP do ADN obtidos no primeiro par de eletrodos. É importante notar que seria impossível calcular as velocidades de condução das fibras do ADN para cada cluster encontrado se o método Woody fosse aplicado aos ERP do ADN dos dois eletrodos independentemente. Isso ocorreria porque os ERP de cada par de eletrodos possuem variações quanto à relação sinal/ruído, latências e morfologia. Logo, a configuração do alinhamento dos ERP do ADN entre os pares de eletrodo seria completamente diferente, perdendo-se a relação temporal original entre os diversos picos que compõe o ERP médio. Uma vez aplicado o método Woody ao primeiro par de eletrodos, obtivemos uma matriz de variações de latência que foi utilizada para corrigir as variações de latência dos ERP correspondentes do outro par. Por exemplo, se o primeiro ERP da matriz **M** do primeiro par de eletrodos foi deslocado de 10 ms em relação ao ERP médio da

iteração, o ERP correspondente do segundo par de eletrodos também foi deslocado de 10 ms e assim por diante. Dessa forma, pudemos garantir que as relações temporais (fase) entre os ERP médios fossem mantidas.

Basicamente, o método de Woody usa a FCC (ver apêndice) como forma de estimar o valor das variações de fase de cada ERP em relação ao PE promediado. Esse valor é dado na latência onde ocorreu o pico máximo dessa função. Cada janela contendo os ERP é então deslocada no tempo, exatamente no valor da variação de fase. Esse processo ocorre de forma iterativa até que, após um certo número de iterações, os ERP do ADN não apresentavam mais variações de fase ou quando os critérios de parada do algoritmo fossem atingidos. Os critérios de parada do algoritmo foram: **(1)** A estabilização do delta do coeficiente de correlação médio da iteração x com a $x-1$ em $10e-5$; **(2)** Tempo máximo de execução da rotina em 120 segundos e **(3)** Número máximo de iterações igual a 20.

Após a correção das variações de fase, a matriz **M** com $w \times n$ elementos para os ERP dos dois pares de eletrodos foi novamente estruturada, agora com n disparos corrigidos. Além dos vetores de variações de fase criamos também vetores contendo a média dos coeficientes de correlação dos n elementos em relação ao PE promediado em cada iteração (Figuras 8, 9, 10, 11). A figura 9 mostra a dinâmica de estabilização da média dos coeficientes em cada iteração para os ERP do ADN obtidos no primeiro par de eletrodos. O coeficiente de correlação representa o quanto uma onda é parecida com uma outra no domínio do tempo, no nosso caso, janelas de disparos do ADN em relação à média da iteração.

A correção das variações de fase foi sempre realizada utilizando trechos análogos do registro, isto é, períodos de hemorragia ou de reinfusão de sangue em

blocos, pois uma de nossas hipóteses é de que possa existir histerese no recrutamento das fibras do ADN entre uma subida e uma descida de PA.

Após essa correção, fizemos a promediação dos n elementos da matriz **M** do primeiro par de eletrodos para uma descida ou subida de PA e também para a PA basal e comparamos essa média com aquela do mesmo período, dos mesmos n elementos, mas antes da correção das variações de latência (figura 10). Essa figura mostra a grande diferença entre as ondas promediadas antes e depois da correção. Como se pode notar, a técnica de Woody foi capaz de eliminar, nas ondas promediadas, o efeito de um filtro passa-baixa gerado pelas variações de fase, além de melhorar a relação sinal/ruído, revelando os disparos das fibras do ADN com grande robustez.

Nosso objetivo era investigar se havia ou não a presença de padrões de atividade do ADN em faixas de PA específicas, de forma que poderíamos traçar uma relação direta entre os ERP do ADN e a PAM. Será que não poderíamos, de forma automatizada, detectar dentro de cada intervalo, formatos de onda que são a “assinatura eletrofisiológica” da atividade do ADN naquela faixa de pressão? Seria possível determinar em que valores de PA esses padrões deixam de existir e onde outros aparecem e reagrupar os ERP do ADN de acordo com esse critério?

Para responder a essas perguntas, utilizamos duas técnicas poderosas, amplamente utilizada em ciências, chamadas de análise de componentes principais (PCA) e clusterização não-supervisionada método *K-means* (Ver apêndice).

4. RESULTADOS

4.1. Registro de PA e do ADN

Os registros da atividade do ADN e de PA estão descritos com detalhes nos materiais e métodos. De forma geral, para todos os animais, as variações de PA se configuraram como mostra a figura1. Na maioria das vezes obtivemos períodos de hemorragia e de reinfusão a cada 60 segundos, com pequenas variações.

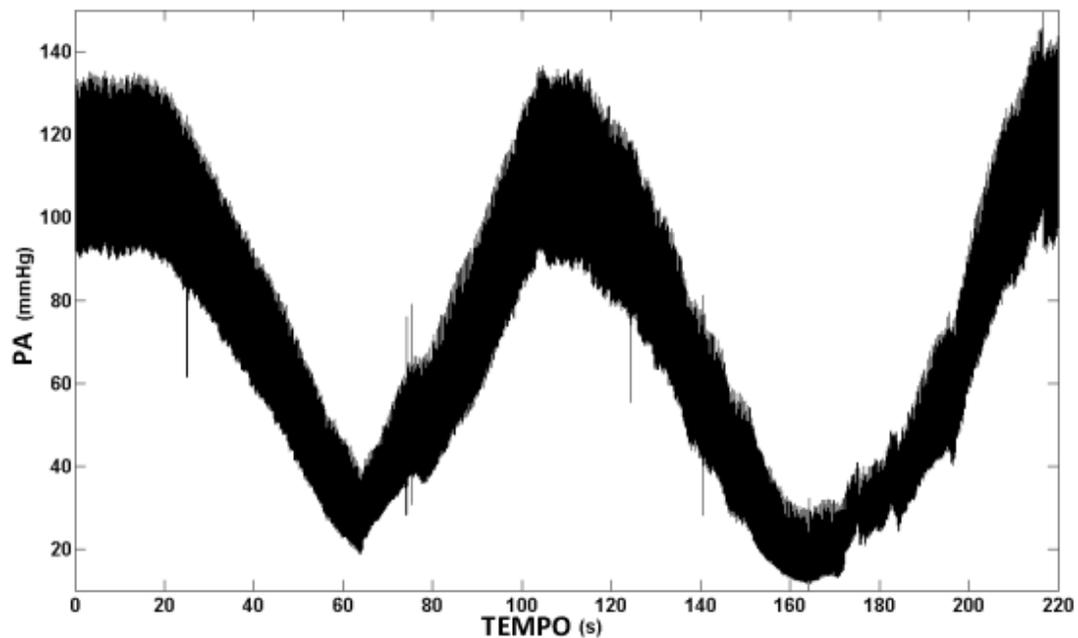


Figura 6 - Registro contínuo de PA durante período controlado de hemorragia e reinfusão de sangue. Durante todo o período era feita a aquisição simultânea dos ERP do ADN.

A figura 7 mostra os registros e valores de PA com os respectivos disparos do ADN em diferentes níveis pressão. Note a quase total supressão da atividade do nervo em valores de PA muito baixos (último traçado à direita). Podemos notar nessa figura e na figura 5 que a atividade do nervo aconteceu antes do pico de pressão pulsátil, o que é totalmente incoerente com a fisiologia do sistema barorreceptor. Isso ocorreu meramente porque o registro da PA foi feito na artéria femoral e dessa forma há um atraso na condução da onda de pulso desde o coração até o transdutor de pressão. Esse fenômeno foi corrigido na hora da realização das janelas de gatilho dos ERP do ADN com o pulso de PA pulsátil.

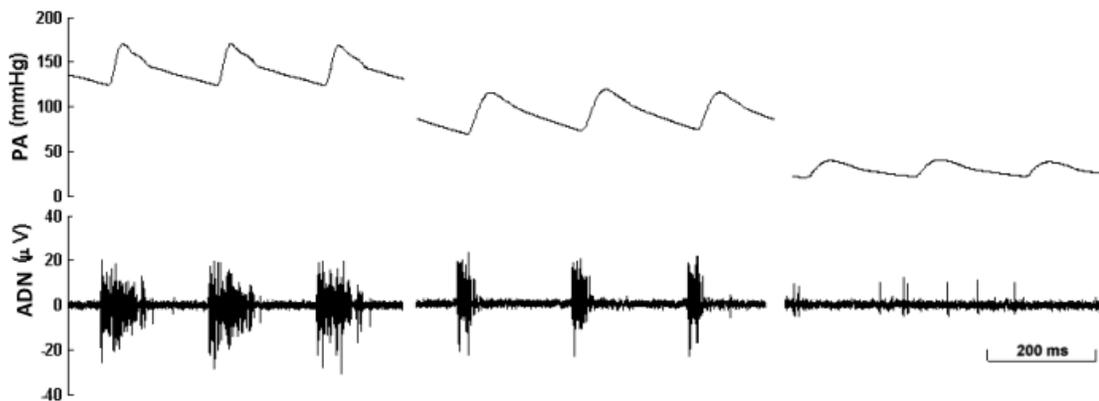


Figura 7 - Registro típico do ADN (traçados inferiores) em diferentes níveis de PA (traçados superiores) durante períodos de hemorragia e de reinfusão controlados.

4.2. Correção de Variações de Fase pela Técnica de Woody

As figuras 8 e 9 mostram o desempenho do algoritmo de correção de latências descrito por Woody para os ERP do ADN apenas do primeiro par de eletrodos. Podemos observar no primeiro gráfico que os erros de latência no início da iteração do algoritmo apresentavam valores altos os quais foram diminuindo a partir da terceira iteração até se estabilizar em zero após a décima sétima iteração. De forma geral, a dinâmica de correção dos erros de latência obedeceu ao padrão mostrado na figura 8.

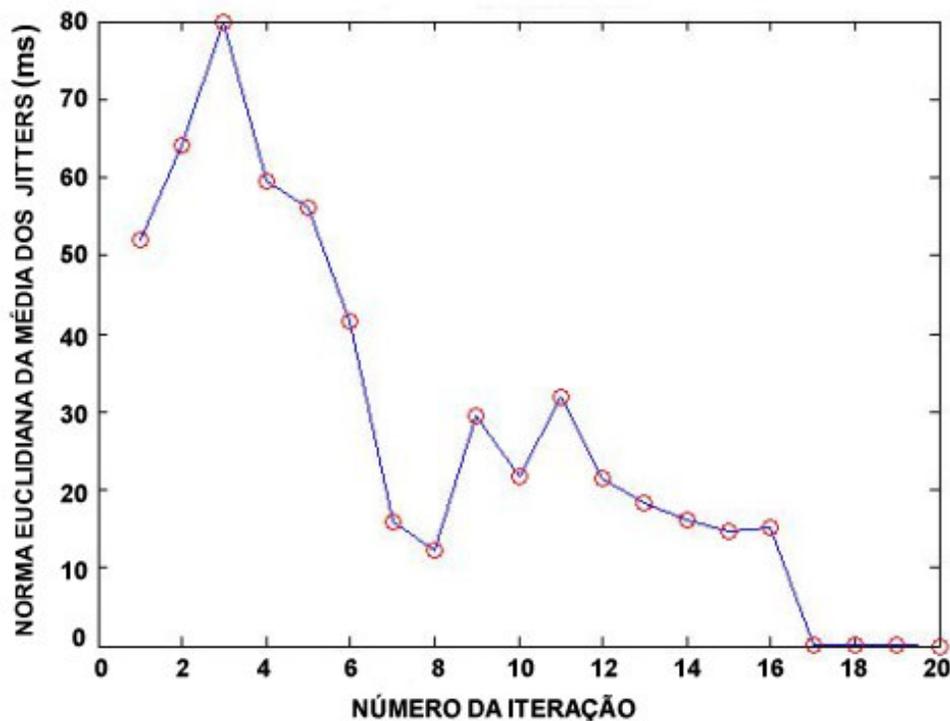


Figura 8 – Dinâmica de correção das variações de fase dos ERP do ADN, adquiridos no período correspondente ao da Figura 1, pelo algoritmo de Woody. Nesse caso, a correção estabilizou-se (zero) com 20 iterações.

A figura 9 mostra a estabilização da média dos coeficientes de correlação de cada iteração do algoritmo de Woody para o primeiro par de eletrodos. Para cada ERP do ADN um valor de coeficiente de correlação foi calculado em relação ao padrão da iteração. Por exemplo, suponhamos que 100 ERP do ADN foram submetidos ao algoritmo. Temos então 100 coeficientes de correlação (para cada ERP do ADN com o ERP padrão da iteração há um coeficiente) para a primeira iteração, para a segunda e assim por diante. A média de todos os coeficientes de cada iteração é o que está representado no gráfico abaixo. Notamos um aumento nos valor da média dos coeficientes mostrando que os ERP do ADN se correlacionavam mais positivamente com o padrão da iteração ao fim do tempo de execução do algoritmo.

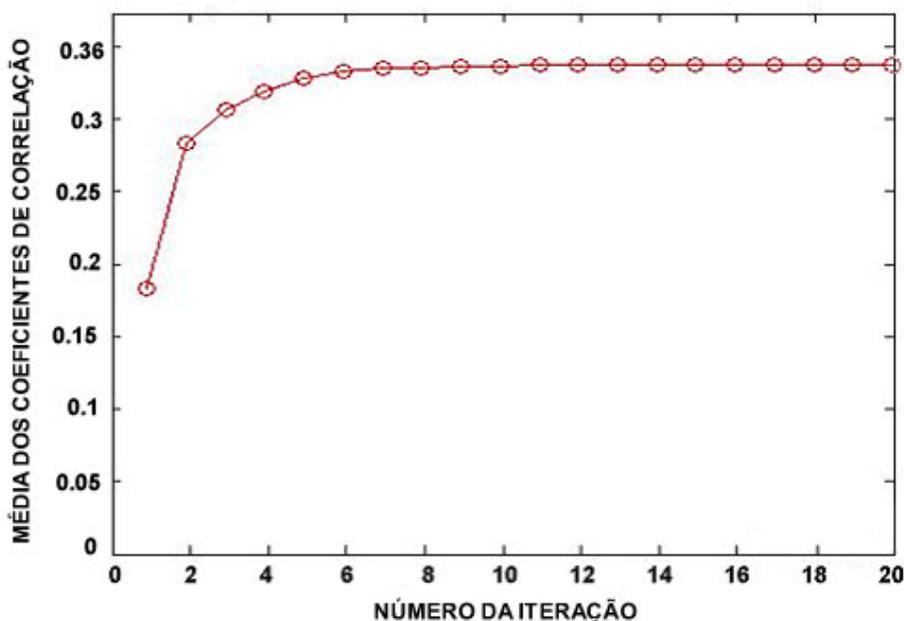


Figura 9 – Dinâmica de estabilização do coeficiente de correlação médio de cada iteração. Note que a estabilização máxima dos coeficientes ocorreu por volta da vigésima iteração, o que corresponde ao que é mostrado na figura anterior.

Com o objetivo de caracterizar eletrofisiologicamente o resultado do método de correção de latência fizemos a promediação dos ERP do ADN do primeiro par de eletrodos antes (A e C) e depois (B e D) da aplicação do algoritmo, tanto para PA basal (figuras superiores) quanto para um período de hemorragia (figuras inferiores). Note que nos dois casos, antes da correção (figuras A e B), há um efeito de um filtro passa baixa na onda promediada, uma baixa relação sinal/ruído e uma baixa energia. Isso ocorre devido à presença de variações de fase nos ERP do ADN. O método Woody foi capaz de corrigir essas variações e melhorar a relação sinal/ruído além de aumentar a energia do ERP, possibilitando a identificação dos disparos dos grupos de fibras que compõe o nervo.

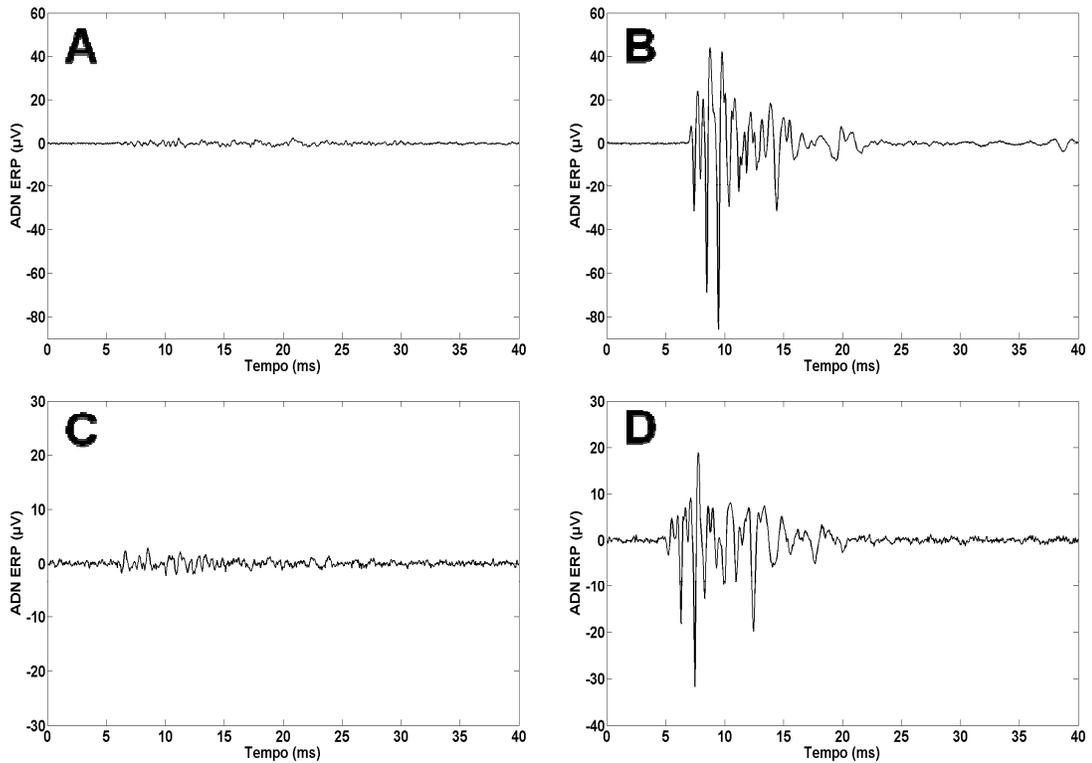


Figura 10 – Média dos ERP do ADN do primeiro par de eletrodos antes (A e C) e depois (B e D) da correção de variações de fase pelo método Woody de um mesmo rato. Figuras superiores representam média de 905 ondas do nervo em PAM basal (105 mmHg) e inferiores representam média de 411 ondas do nervo durante dois períodos de hemorragia (PAM variou de 105 mmHg até 15.5 mmHg).

4.1. Realização da PCA e da Técnica de Clusterização

Uma vez tendo as latências corrigidas, as matrizes de dados, correspondentes aos dois pares de eletrodos, com os ERP do ADN foram submetidos à PCA para redução dimensional. As três primeiras componentes principais foram utilizadas no algoritmo de classificação K-means. A figura 11 mostra o espaço tridimensional em que cada eixo representa uma componente principal. Os pontos vermelhos correspondem aos ERP do ADN do primeiro par de eletrodos que aconteceram em um período de hemorragia já com as latências corrigidas e com a dimensão reduzida. A figura 12 mostra o mesmo conjunto de dados anterior após a aplicação do algoritmo de classificação K-means. Cada cor representa a existência de um cluster de ERP do ADN.

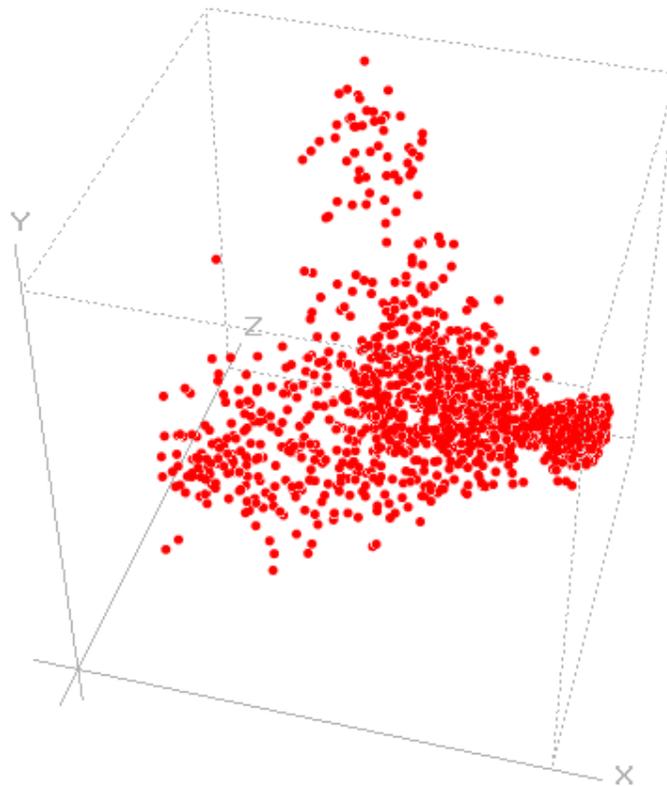


Figura 11 – Representação visual das três primeiras componentes principais dos disparos captados pelo primeiro par de eletrodos ocorridos no período de variação de PA da figura 1. Uma matriz contendo em cada coluna um formato de onda do ADN é submetida ao PCA. Nesse gráfico, cada eixo é uma das três primeiras componentes principais e cada ponto representa um disparo do ADN. As três primeiras componentes principais contêm mais de 95% da variância da matriz original. Utilizamos essas componentes no algoritmo de classificação não supervisionado (KlustaWin – Ver apêndice)

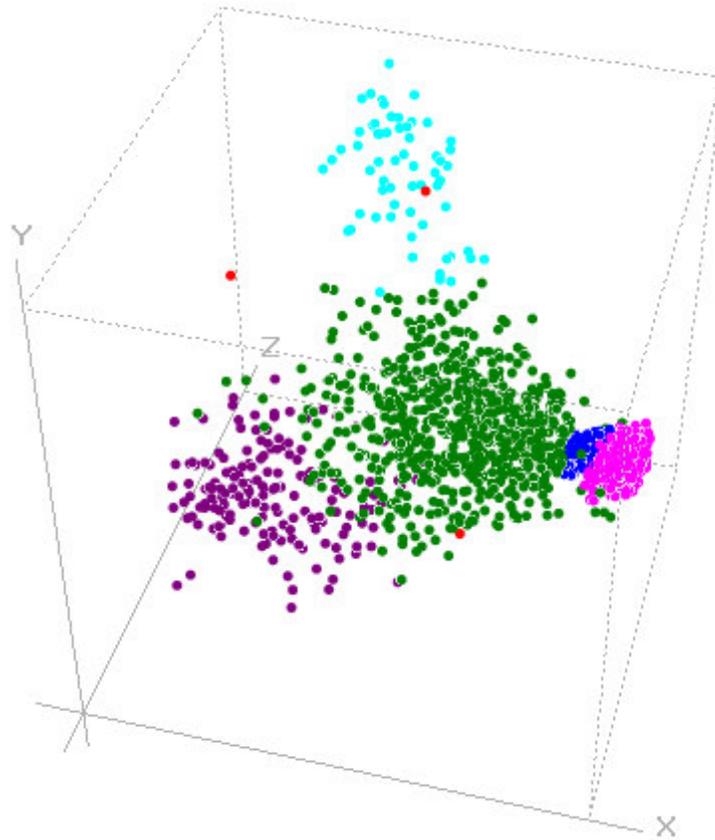


Figura 12 – Representação das mesmas componentes da figura anterior após a aplicação do algoritmo de classificação. Note que o algoritmo detectou a existência de 6 clusters (sendo que 1 é ruído: cor vermelha) de disparos do ADN.

Para todos os animais o mesmo procedimento foi realizado (Registro→Correção de Latências→PCA→Classificação). A figura 13 representa a PAM de um outro rato, mostrando os períodos de variação de PA. A figura 14 corresponde à figura 13, mas agora em cores para realçar os períodos de ocorrência dos clusters dos ERP do ADN na curva de PAM.

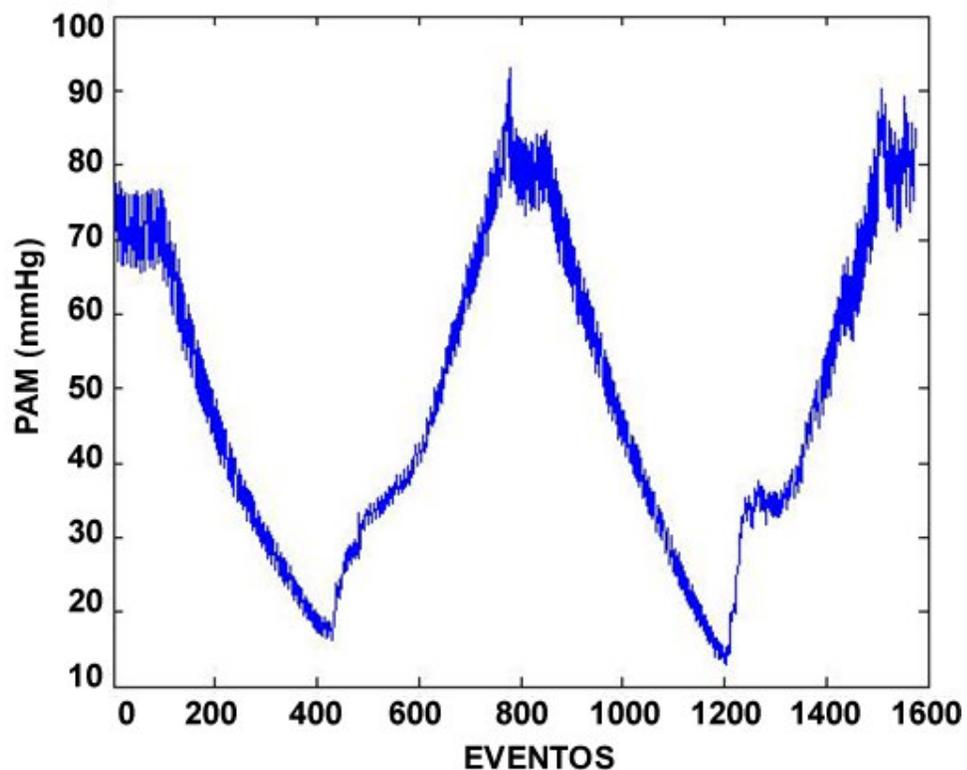


Figura 13 – Registro contínuo de PA de outro rato, análogo à figura 1. Note a presença de períodos de hemorragia e reinfusão de sangue. Realizou-se seguidamente a análise de correção de variações de fase, PCA e clusterização, nessa ordem, gerando a figura seguinte.

Note a presença do mesmo cluster em períodos análogos da curva (entre quedas e aumento da PA) além da existência de faixas relativamente específicas de PAM em cada cluster.

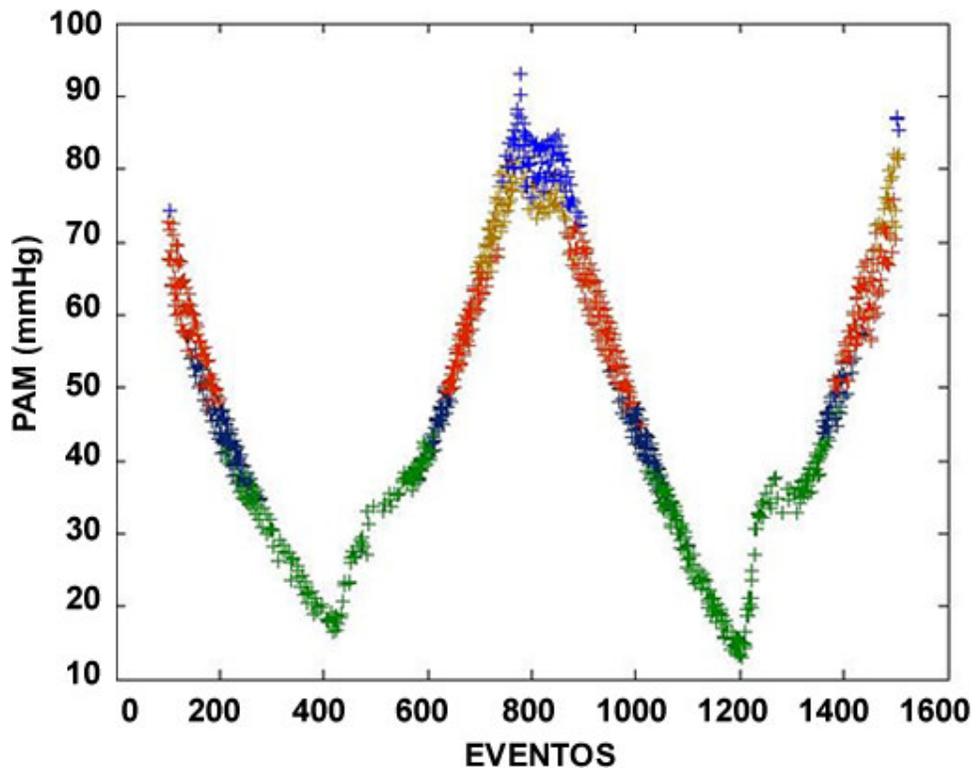


Figura 14 – Registro contínuo de PA do mesmo rato da figura anterior. Realizou-se seguidamente a análise de correção de variações de fase, PCA e clusterização, nessa ordem. Cada cor representa um cluster de atividade do ADN.

Para todos os animais e para todos os períodos de variação de PAM as análises de correção de latência, PCA e clusterização foram realizadas. A figura 15 mostra os valores de PAM de cada cluster em ordem decrescente. Entre os clusters C1, C2 e C3 não detectamos diferença estatística na PAM (#). Em contrapartida entre os demais clusters a PAM foi significativamente diferente (*).

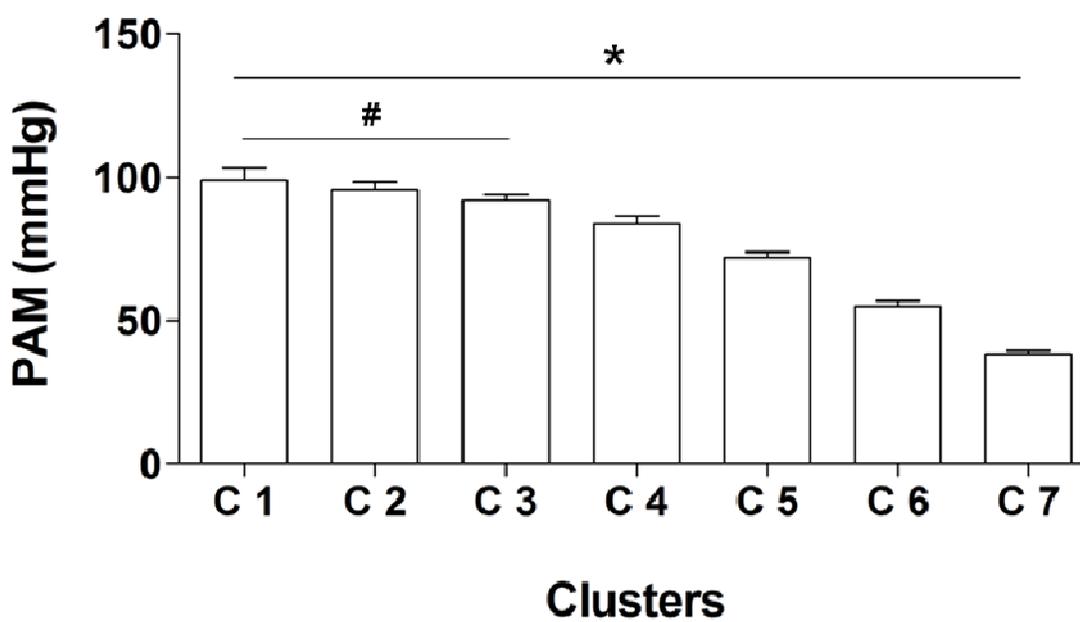


Figura 15 – Separação dos clusters de atividade do ERP do ADN por PAM - C1: 100.5mmHg \pm 14.80; C2: 95.80 mmHg \pm 13.58; C3: 91.93mmHg \pm 14.46; C4: 84.10 mmHg \pm 16.85; C5: 72.02mmHg \pm 14.32; C6: 55.12mmHg \pm 13.08; C7: 38.34 mmHg \pm 8.832 (One-Way ANOVA * $p < 0.001$; # $p > 0.05$; $n = 8$.)

Realizamos também análises individualizadas dos valores de PAM de cada cluster para períodos de hemorragia e reinfusão de sangue com o objetivo de testarmos a presença de histerese. Esses valores não foram estatisticamente significativos entre as duas curvas.

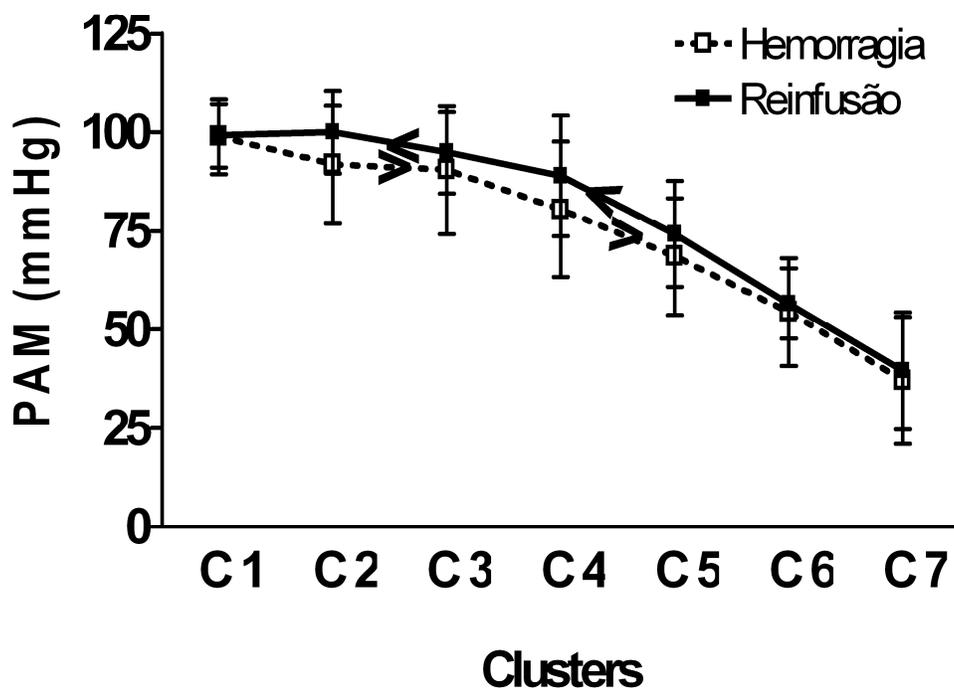


Figura 16 – Separação dos clusters de atividade do ERP do ADN por PAM durante loop de hemorragia e reinfusão de sangue. Apesar de não existir diferença estatisticamente significativa entre os clusters nos dois períodos, pode-se notar uma tendência à histerese. (n = 8, Two-Way ANOVA $p = 0.15$)

A caracterização eletrofisiológica dos clusters do nervo em termos de forma de onda, energia e velocidade de condução está evidenciada nas figuras 17 e 18. Cada onda da figura 17 representa a média de todos os ERP identificáveis e pertencentes a um determinado cluster (C1, C2, C3 e C4), sendo que as ondas em cor vermelha pertencem ao primeiro par de eletrodos e as em cor azul pertencem ao segundo par, para um mesmo animal. A PAM correspondente está em ordem decrescente de cima para baixo e da esquerda para direita (ver legenda). À medida que os valores de PAM vão diminuindo, podemos observar a diminuição de amplitude e do número de picos dos ERP tanto para os ERP do ADN do primeiro par de eletrodos quanto para os do segundo. A energia (RMS) de cada cluster para o primeiro par de eletrodos também está representada no gráfico de barras. Podemos notar uma diminuição da energia em clusters que ocorreram em níveis menores de PAM (C1→C4)

Para maior detalhamento dos ERP médios, selecionamos no cluster 2 da figura 17 uma janela temporal menor (12 ms), a qual está representada na figura 18. Nessa figura estão identificados com setas (A/A' e B/B') os disparos correspondentes ao ERP médio desse cluster nos dois pares de eletrodos. Podemos perceber claramente a presença de defasagem entre as ondas o que nos permitiu calcular a velocidade de condução entre elas. Para ambos os disparos mostrados na figura 18 a velocidade de condução foi de 10 m/s.

Na figura 19 está representado, somente para o primeiro par de eletrodos, o ERP médio dos clusters C1 (traçado pontilhado) e C3 (traçado contínuo). Podemos notar que determinados disparos não mudaram sua latência (setas com valores), mas apresentaram um aumento de amplitude quando a PAM atingiu níveis mais altos (de 77.29 ± 12.30 mmHg para 107.20 ± 01.75 mmHg). Além disso, foi possível

identificar o surgimento de novas ondas de curta latência no cluster C1 em relação ao C4 (setas com símbolo #) com o aumento da PAM.

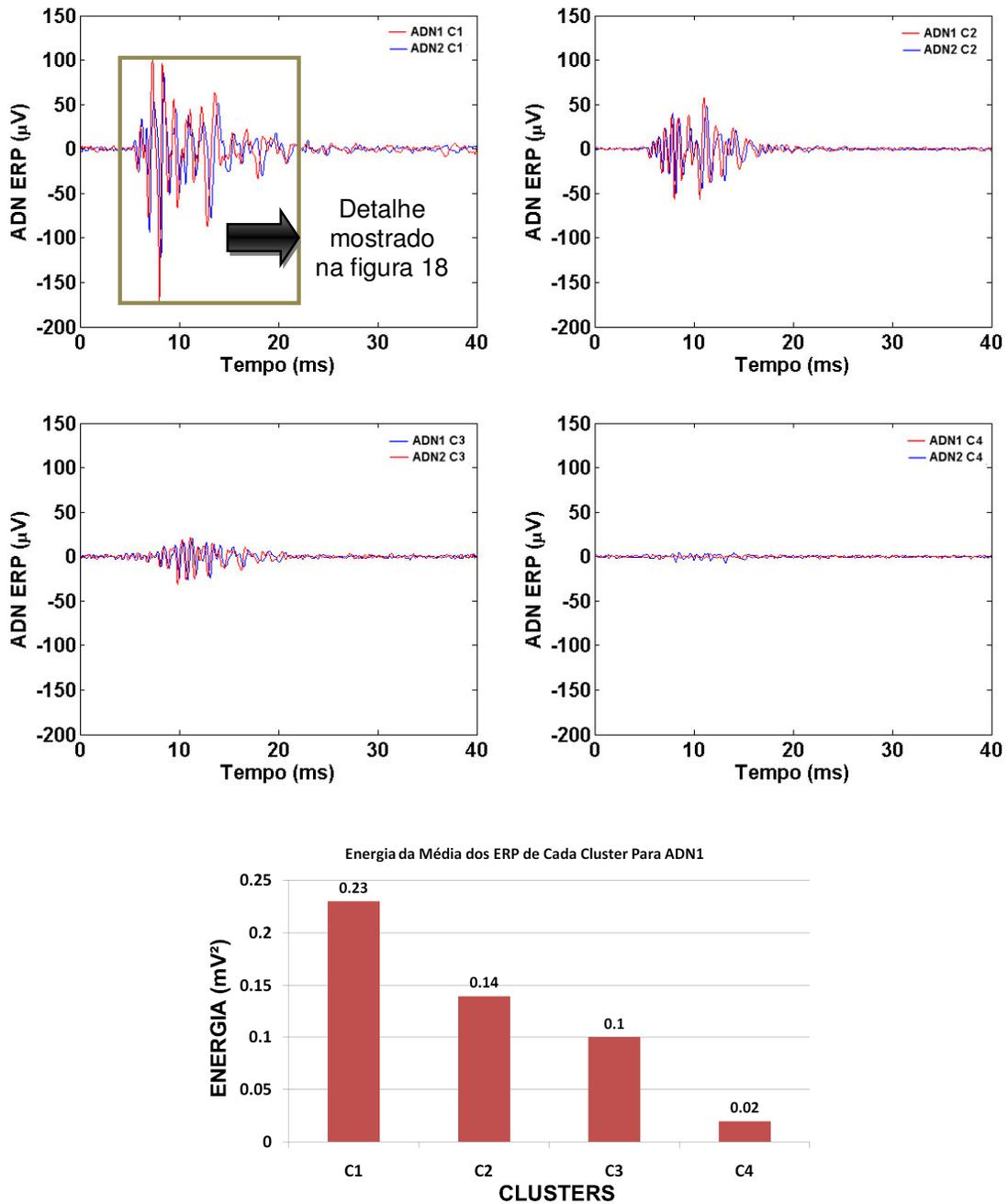


Figura 17 – As figuras representam o ERP médio de cada cluster, para os registros do primeiro par de eletrodos (ADN1 em vermelho) e para o segundo par (ADN2 em azul). Note a defasagem presente entre as ondas. O gráfico de barras representa a energia média de cada cluster para o ADN1. Esses gráficos correspondem a um

período de hemorragia de um rato: C1: 103.6 ± 04.2 mmHg / Média de 48 ondas; C2: 87.91 ± 09.50 mmHg / Média de 134 ondas; C3: 69.4 ± 9.32 mmHg / Média de 61 ondas; C4: 41.67 ± 10.31 mmHg / Média de 145 ondas. Valores de PAM expressos como média \pm desvio padrão.

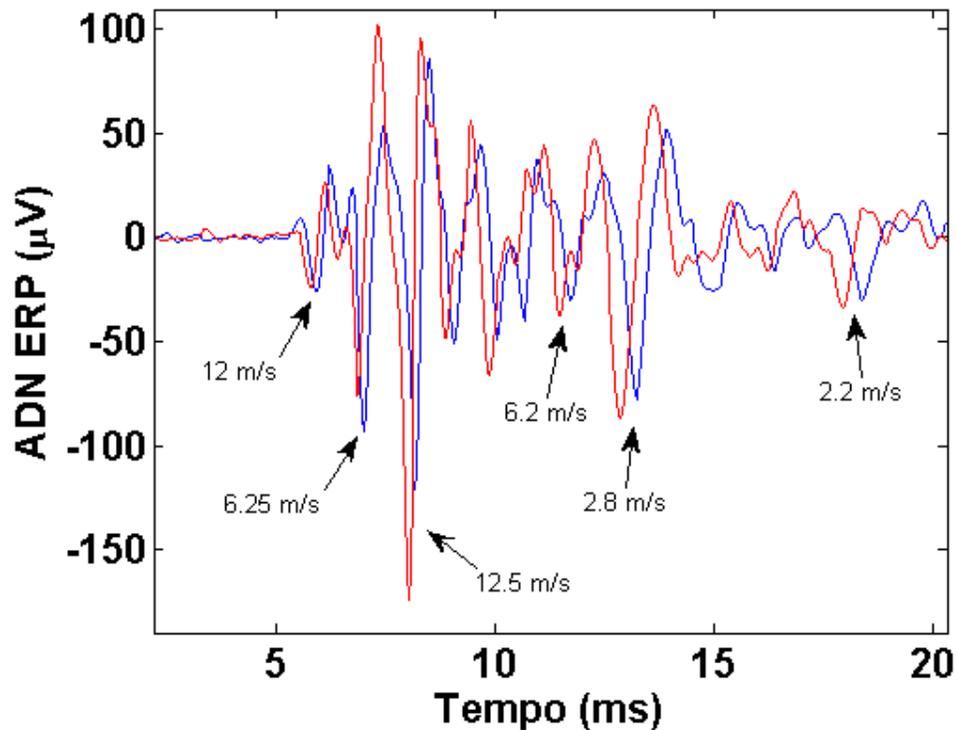


Figura 18 – ERP correspondente ao Cluster 1 do primeiro par de eletrodos (em vermelho) e do segundo par (em azul), os mesmos da figura anterior. Note a presença de defasagem entre os picos. Sabendo-se que a distância entre os pares de eletrodo é de 1mm, foi possível calcular a velocidade de condução para os pares de ondas como mostra a figura.

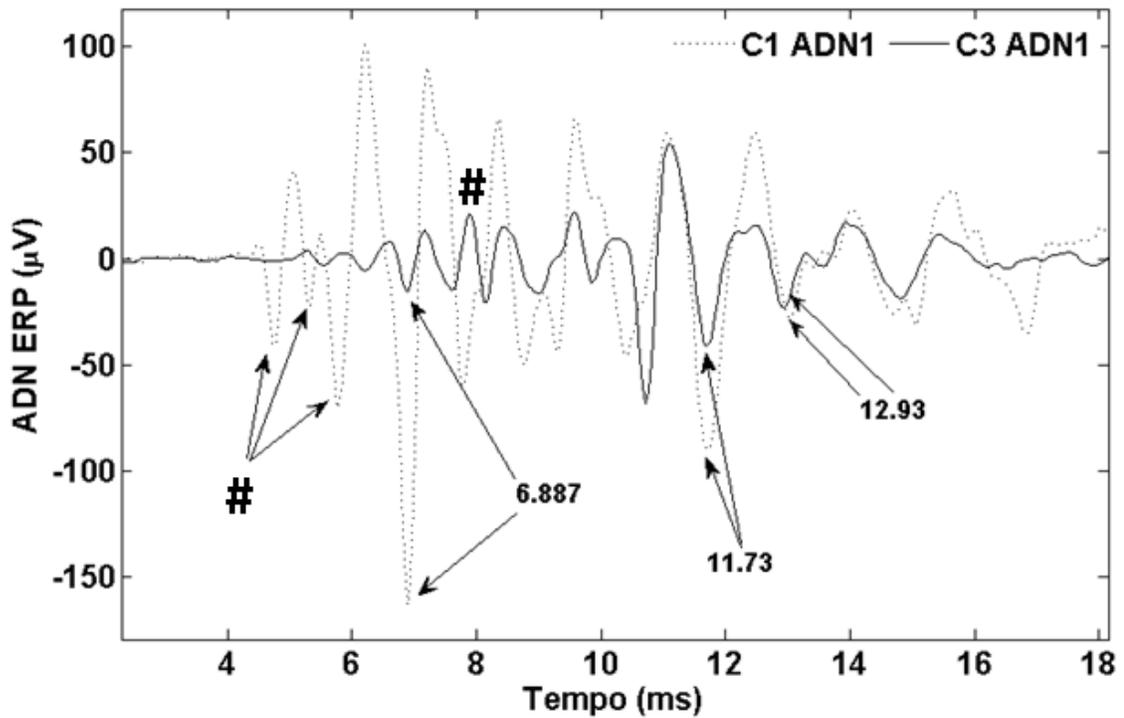


Figura 19 – Clusters C1: 103.60 ± 4.2 mmHg / Média de 48 ondas e C3: 69.4 ± 9.30 mmHg / Média de 61 ondas (os mesmos da figura 17) somente para o primeiro par de eletrodos em janela temporal menor (12 ms) para mostrar latências e amplitudes dos disparos do nervo. Note a presença dos mesmos vales (setas com valores de latência fixos) nos dois clusters e o surgimento de novos, de curta latência, (setas com símbolo #) em C1.

5. DISCUSSÃO

O objetivo principal deste trabalho foi investigar a ocorrência de padrões ou clusters de atividade do ADN em ratos anestesiados durante variações agudas de PA utilizando eletrofisiologia e técnicas de análise e processamento de sinais. Podemos considerar como achado principal, não somente a detecção de clusters do ERP do ADN, mas também a ativação PA-dependente dos mesmos.

Registros do ADN esquerdo foram adquiridos com sucesso por meio de aparato microcirúrgico, propiciando tempo cirúrgico e de registro ótimos além de excelente relação sinal/ruído. Fazan e colaboradores [70] descreveram que o ADN de ratos Wistar normotensos é monofasciculado, sendo o diâmetro desse fascículo constante (40 μm), desde sua origem (próxima ao arco da aorta – segmento distal do nervo) até sua terminação (no nervo laríngeo superior – segmento proximal do nervo). O nervo depressor aórtico apresenta, em média, 440 axônios, sendo 20% mielinizados e 80% amielínicos. O histograma de distribuição de tamanho das fibras mielínicas é unimodal e essas fibras apresentam diâmetro médio de 2,5 μm . Esses dados mostram que o ADN é um nervo extremamente fino e delicado e qualquer manobra brusca durante o ato cirúrgico pode lesá-lo, suprimindo sua resposta ou pelo menos comprometendo a qualidade do sinal.

Vale ressaltar que a cirurgia de isolamento e registro do ADN é realizada em poucos centros no Brasil devido à sua complexidade. Em 1958, McCubbin e colaboradores [71] descreveram o trajeto cervical do ADN em ratos normotensos da linhagem Sprague-Dawley. Os autores verificaram que, embora os animais estudados fossem da mesma linhagem, seu trajeto cervical é muito variável e esses

nervos estão presentes, no lado esquerdo, como um fascículo isolado, em apenas metade dos animais. No nosso caso, além da dificuldade inerente à técnica cirúrgica, em apenas um terço, aproximadamente, dos animais operados o ADN foi identificado como um nervo isolado. No lado direito, a freqüência de aparecimento do ADN isolado é ainda menor. Esses mesmos pesquisadores observaram que quando o ADN não era identificado como um fascículo isolado, a atividade barorreceptora era registrada no nervo vago ou no nervo laríngeo recorrente. Neste trabalho não realizamos registros do ADN direito nem do nervo laríngeo ou do nervo vago.

A primeira etapa da análise dos dados foi a aplicação do método Woody para correção de variações de fase dos ERP do ADN. Inicialmente, fizemos a média de todos os ERP do ADN, antes da correção de variações de fase, correspondentes aos períodos de PAM basal (Fig. 3 A e B) e durante trechos análogos de variação de PA (períodos de hemorragia e de reinfusão de sangue) (Fig. 3 C e D), para cada animal. Como era de se esperar, houve um efeito de um filtro passa baixa na média em ambos os casos e uma baixa relação sinal/ruído (Fig. 3 A e C). Isso ocorreu devido à presença de variações de fase nos ERP, levando ao cancelamento das ondas ao se fazer a promediação. Entretanto, após a aplicação do método de correção de variações de fase, detectamos uma melhora patente na relação sinal/ruído das médias bem como a perfeita identificação dos picos existentes nos ERP do ADN (Fig. 3 B e D). De forma geral, com vinte iterações do algoritmo obtivemos a estabilização da norma euclidiana dos vetores de erros de latência ao mesmo tempo em que a média do coeficiente de correlação dos ERP com o padrão da iteração correspondente se estabilizava em valores maiores (Figs. 8 e 9).

Um dos problemas do método descrito por Woody está no fato de que o ajuste das latências de certos ERP do ADN, principalmente aqueles que ocorreram em níveis de PA muito baixos, tenha ocorrido com o alinhamento de disparos de maior amplitude em ERP que ocorreram em PA maiores. Nesse caso a média final das ondas após a correção dos erros de latência não era totalmente reprodutiva dos ERP a originou. Apesar de disso, o método descrito por Woody foi crucial e permitiu que prosseguíssemos com as análises para a determinação dos clusters de disparos do ADN de acordo com a PA.

Outra questão importante com relação ao método Woody foi o uso da matriz de erros de latência dos ERP do primeiro par de eletrodos para a correção de fase dos ERP do segundo par. Isso garantiu que a relação temporal entre os disparos correspondentes dos ERP registrados no primeiro e segundo par fosse mantida, permitindo calcular a velocidade de condução das ondas.

Após a correção das latências submetemos as épocas contendo os ERP livres de variações de fase à PCA para redução dimensional. Sabidamente, métodos de clusterização com o utilizado neste trabalho (K-means) tornam-se mais robustos quando a matriz de dados que se deseja classificar possui dimensão reduzida [72] (ver apêndice). Cada ERP do ADN possuía um grande número de amostras (3000 - janela de 120 ms) e portanto a redução dimensional foi mandatória para a garantia inicial de uma boa classificação. Com a redução dimensional obtivemos 95% da variância dos ERP do ADN nas três primeiras componentes principais.

Essas componentes foram submetidas ao método K-means de clusterização, onde encontramos 7 clusters com os respectivos valores de PAM: C1: 100.5mmHg \pm 14.80; C2: 95.80 mmHg \pm 13.58; C3: 91.93mmHg \pm 14.46 (One-Way ANOVA, $p > 0.05$); C4: 84.10 mmHg \pm 16.85; C5: 72.02mmHg \pm 14.32; C6: 55.12mmHg \pm 13.08;

C7: $38.34 \text{ mmHg} \pm 8.832$ (One-Way ANOVA, $p < 0.001$). Entre os clusters 1 e 3 não houve diferença estatisticamente significativa na PAM ao passo que entre os clusters 4 e 7 e entre esses e os clusters 1 e 3 houve diferença estatisticamente significativa.

Entre os ratos encontramos algumas variações no número de clusters para trechos análogos de variação de PAM. Por exemplo, um rato apresentou 6 clusters na primeira hemorragia (primeira queda de PA da Fig. 1) enquanto outro apresentou, para o mesmo trecho, 7 clusters. Essas variações podem ser explicadas por: (1) fenômeno inerente ao método K-means, uma vez que a inicialização (distribuição dos K centróides) do algoritmo ocorre de forma totalmente randômica (ver apêndice) levando a variações na configuração final dos clusters; (2) todo o processo de variação de PA foi feito manualmente e por isso a inclinação das curvas de hemorragia e reinfusão, apesar de não variarem significativamente entre os ratos em termos de valores máximos/mínimos e tempo de descida/subida, eram diferentes na sua dinâmica temporal das descidas e subidas. Nas curvas em que não obtivemos variações rápidas pode ter havido a adaptação dos barorreceptores, um fenômeno que ocorre na escala de segundos a poucos minutos, descrito em 1956 por Mccubbin e colaboradores [73]. Eles registraram preparações de multifibras das aferências barorreceptoras em cães controle e em cães com hipertensão arterial nefrogênica. Em cães controle, eles observaram que em valores de PAM iguais a 60 mmHg o nervo disparou de forma fásica e sincronizada com a onda de pressão pulsátil, o que não aconteceu nos cães hipertensos. A 120 mmHg o padrão fásico foi observado em ambos os grupos. Entretanto, quando a PAM atingia valores próximos de 240 mmHg, atividade nervosa foi contínua (saturada) em cães normais,

mas ainda fásica nos cães hipertensos. Os autores concluíram que nos cães hipertensos os barorreceptores se adaptaram a níveis mais altos de PA.

Devido a isso, no nosso caso, padrões de atividade do ADN que deveriam ocorrer em um nível de PA específico passaram também a ocorrer em trechos vizinhos e por isso foram classificados como pertencentes a um mesmo cluster. No presente trabalho não realizamos hipertensão nem hipotensão arterial persistentes para estudar a adaptação dos aBR.

Informações aferentes que chegam ao NTS originadas de diferentes tipos de fibras do ADN têm sido implicadas como importantes sinalizadores para o processamento e codificação central da PA. Fan e colaboradores [74] utilizando estimulação elétrica juntamente com bloqueio anodal do ADN demonstraram que fibras tipo-A e tipo-C atuam sinergicamente no controle cardíaco e da PAM. Essas fibras apresentam diferenças fundamentais na frequência de resposta durante estimulação elétrica do nervo corroborando a idéia de que as informações que trafegam nos diferentes tipos de barorreceptores aórticos e que chegam ao NTS têm papel importante na fisiologia do controle rápido da PA.

Em outro estudo, Liu e colaboradores [75] realizaram registros no NTS de ratos anestesiados simultaneamente com a monitorização da atividade simpática lombar com o objetivo de se investigar o fenômeno de depressão frequência-dependente. Esse fenômeno ocorre quando sinais de alta frequência provenientes do ADN chegam ao NTS e em neurônios de segunda ordem, culminando com eventos sinápticos que limitam a transmissão da informação. Esse limite permite não somente a otimização da transmissão sináptica proximal da via do barorreflexo como também diminui a magnitude da inibição simpática na saída da via, impedindo flutuações excessivas na PA. Os autores mostraram que determinados padrões de

atividade do ADN (fásicos) eram capazes de elicitar depressão frequência-dependente no NTS de forma mais ampla que outros padrões.

Outro mecanismo central de filtro da atividade aferente barorreceptora que é determinado pela atividade periférica do ADN é a inibição tempo-dependente. Sinais aferentes que trafegam dentro de intervalos de 50 a 400 ms diminuem a responsividade do NTS à mesma ou à outra modalidade sensorial [76]. Seller e Illert [77] postularam que esses mecanismos seriam responsáveis pela manutenção da “reserva funcional” capaz de integrar sinais aferentes barorreceptores.

Em conjunto, esses e outros estudos mostram claramente como a codificação central da PA pode ser afetada a partir da atividade periférica do ADN. Nossos resultados sugerem a existência de padrões de atividade do ADN que operam em faixas específicas de PA, com possíveis implicações para a codificação pressórica central. A assinatura eletrofisiológica de quatro clusters do nervo é mostrada na figura 17, para o primeiro e segundo pares de eletrodo. Podemos notar um claro aumento da amplitude e do número de picos do nervo à medida que a PAM aumenta (C4 → C1) além da defasagem sempre presente entre os ERP dos pares de eletrodo. A figura 19 mostra os mesmos clusters (C1 e C3) da figura anterior, mas em uma janela temporal menor. Podemos notar a presença de picos com latências fixas (setas com valores) ao mesmo tempo em que surgem ondas novas de curta latência (setas com símbolo #). De acordo com a literatura, esses picos de curta latência correspondem as fibras-A do ADN, que possuem baixo limiar de ativação, grandes velocidades de condução e padrão temporal característico [39, 78]. A mudança da PAM dos níveis de C4 para C1 leva não somente ao surgimento de novas fibras do nervo, provavelmente com limiar diferente, mas também ao

recrutamento de um maior número de fibras que já disparavam naquela pressão (maior amplitude).

A figura 16 mostra os valores de PAM de cada cluster para as curvas de hemorragia e rinfusão e sangue. Não houve histerese entre os clusters dos ADN durante descidas e subidas de PAM. A presença de histerese está classicamente relacionada à adaptação rápida dos barorreceptores e já foi demonstrada em coelhos [47], cães [48] e ratos [49]. No nosso caso a ausência de histerese se deve ao fato de não termos avaliado a curva de atividade do ADN (que certamente exibiria um padrão de histerese devido à rápida adaptação do sistema), mas sim dos níveis de PAM em que cada cluster aconteceu.

O motivo pelo qual utilizamos um eletrodo com dois pares de registro diferencial (veja figura 2) foi para possibilitar o cálculo da velocidade de condução das fibras do ADN. Como os dois canais de registro do nervo possuíam a mesma frequência de amostragem e como os pares de eletrodo estavam separados um do outro por uma distância fixa de 1 mm foi possível identificar defasagens na latência dos disparos originais correspondentes e dessa forma calcular a velocidade de condução. Para fibras rápidas encontramos valores entre 4 e 12 m/s e para fibras lentas valores de 0.5 e 3 m/s [79]. De forma geral, não detectamos diferenças em termos de velocidades das ondas dos ERP do ADN entre os clusters. Essas diferenças nas velocidades de condução foram constatadas para um mesmo cluster, entre os pares de eletrodos.

É razoável considerar que a atividade barorreceptora não sofra influência somente de valores absolutos de PAM, mas também de outros parâmetros como dp/dt máxima, duração, intensidade e frequência de variação da PAM [80]. Isso

poderia explicar a inexistência de diferença estatisticamente significativa nos valores da PAM dos três primeiros clusters da figura 17.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSÕES

Podemos concluir deste trabalho que a ativação diferencial de tipos de barorreceptores aórticos leva a diferentes padrões de atividade do ADN organizados em cluster eletrofisiologicamente detectáveis que são recrutados em faixas específicas de PA. Esses resultados podem contribuir para o melhor entendimento de como a sinalização periférica aferente do ADN influencia a codificação central do controle rápido de PA, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas.

CAPÍTULO 7

7. APÊNDICE

Este apêndice tem por objetivo descrever brevemente as definições matemáticas subjacentes a algumas das análises usadas neste trabalho. Algumas são técnicas cotidianas nas disciplinas de análise e processamento de sinais.

7.1. Método Woody e Função de Correlação Cruzada

O método Woody está mostrado nesse organograma:

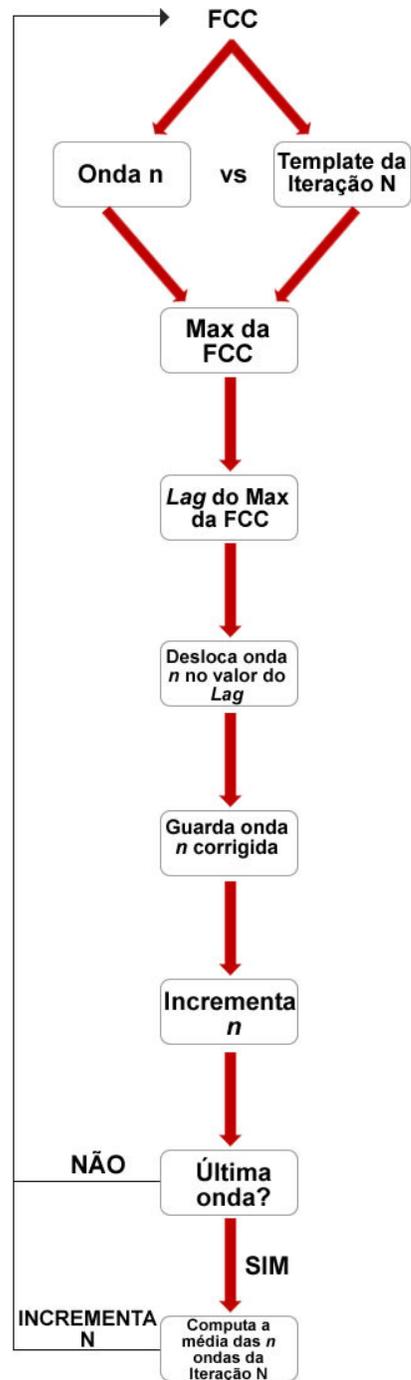


Figura 20 – Método de funcionamento do algoritmo de correção de variações de fase (Woody, 1967)

Dadas duas séries temporais, pode-se buscar uma correlação temporal entre esses sinais. Simplesmente divide-se uma janela de observação em pequenos intervalos de igual duração para série temporal, e para cada intervalo, no eixo x marca-se no eixo Y a soma dos disparos ocorridos em ambos os intervalos.

Ou, formalmente, um trem de disparos do ADN j é dado por:

$$(1) \quad x_j^n(t) = \begin{cases} 1, & \text{se há um disparo entre } t \text{ e } t+\Delta t \\ 0, & \text{se não há} \end{cases}$$

onde t indica o tempo a partir do início, n é o índice para múltiplas janelas de observação ($n= 1, 2, 3, \dots, M$), e $\Delta t = 1 \text{ ms}$, a função de correlação cruzada entre os as séries temporais j e k será:

$$(2) \quad CCF_{jk}(\tau) = \frac{1}{N} \sum_n^N \sum_t^T x_j^n(t) x_k^n(t+\tau)$$

onde T denota a duração da janela de observação. Dessa forma, a FCC descreve adequadamente a natureza da dependência estatística entre os dois sinais.

7.2. Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais é uma ferramenta estatística que pode ser utilizada com dois objetivos básicos:

- redução de dimensionalidade de um conjunto de dados;
- identificação das variáveis mais importantes no espaço das componentes principais (PC)

Essa análise consiste em se reescrever as variáveis originais em novas variáveis denominadas PC, através de uma transformação algébrica de coordenadas. As PC são as novas variáveis geradas através de uma transformação matemática realizada sobre as variáveis originais sendo que cada PC é uma combinação linear de todas as variáveis originais. Graficamente, pode ser descrita como a rotação de pontos existentes em um espaço multidimensional originando eixos, ou PC. Por exemplo, um sistema com oito variáveis, após a transformação, terá oito PC. Cada uma destas PC, por sua vez, será escrita como uma combinação linear das oito variáveis originais. Nestas combinações, cada variável terá uma importância ou peso diferente. No presente trabalho, a PCA foi usada para operar uma redução dimensional das matrizes contendo os formatos de onda do ADN, uma vez que a classificação torna-se mais robusta quando conjuntos de dados nos quais se deseja aplicar o método possuem dimensão reduzida [72].

As Figuras 11 e 12 mostram a representação gráfica tridimensional das três primeiras PC calculadas pela PCA para uma matriz de disparos do ADN. Esses dados foram submetidos ao algoritmo de classificação, que nesse caso revelou cinco agrupamentos de pontos coloridos, sendo que cada cor representa um cluster. Pode-se então, recorrendo a matriz de dados originais e ao vetor de estampas de

tempo desse registro, separar cada grupo de disparos e seu instante de ocorrência e em que faixa de PA eles pertencem.

7.3. Clusterização Não-Supervisionada

A clusterização foi realizada utilizando um algoritmo de classificação multivariada não supervisionado [81] que considera os formatos de onda dos disparos do ADN como uma mistura de variáveis aleatórias de distribuição gaussiana [82] em uma implementação para Windows¹ (KlustaWin W. J. Heitler (University of St. Andrews, St. Andrews, UK), algoritmo de K. D. Harris (Rutgers University, Newark, NJ)), chamado de K-means. A escolha desse método se deve ao fato de ele ser amplamente usado em diversas áreas da ciência, ser de fácil implementação e uso além de ser rápido em termos de análise. O procedimento do algoritmo é, em primeiro lugar, selecionar aleatoriamente k objetos do conjunto de dados, onde cada um destes objetos representará inicialmente uma média do centro de cada grupo. A seguir os demais objetos são classificados nos grupos para os quais apresentam maior similaridade.

O parâmetro utilizado como medida de similaridade é a distância euclidiana. O processo iterativo consiste na atualização dos centros de grupos, através da média das coordenadas dos pontos de cada grupo de tal forma que a similaridade dentro dos grupos seja alta enquanto que a similaridade entre os grupos seja pequena. Um problema do método K-means é que ele é dependente da configuração inicial dos centróides, um processo totalmente aleatório, que pode levar a classificações pobres em termos de separação dos clusters [72]. Em decorrência disso, após a aplicação do método, fizemos uma análise heurística da qualidade da classificação resultante. Felizmente, esse problema foi observado apenas em registros do ADN cuja relação sinal/ruído era insatisfatória. Esses registros foram excluídos da análise.

¹ O programa foi baixado em <http://www.st-andrews.ac.uk/~wjh/klustawin/>

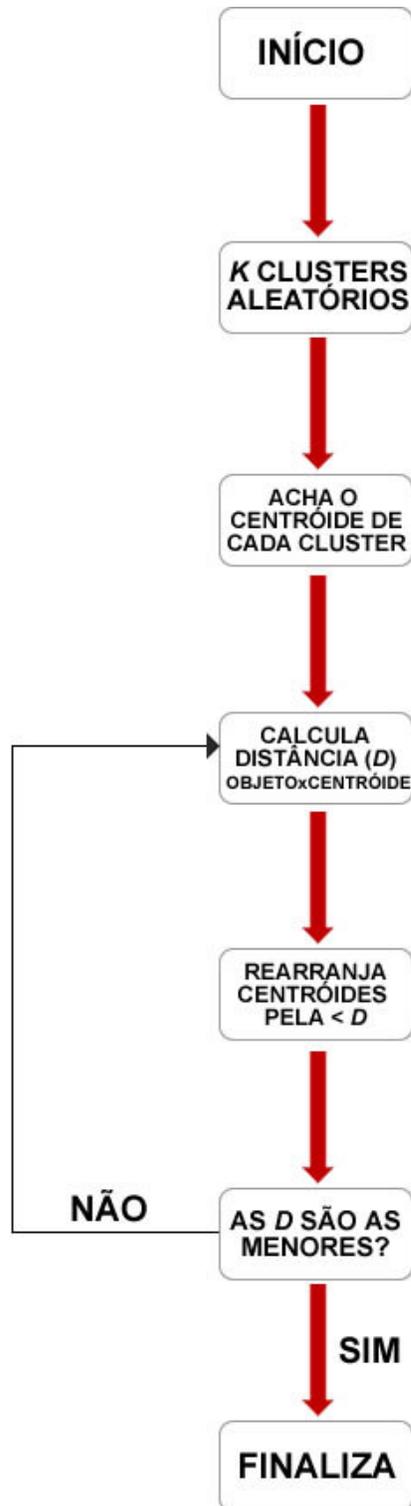


Figura 21 – Método de funcionamento do algoritmo k-Means de clusterização.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Thrasher, T.N., H.-G. Chen, and L.C. Keil, *Arterial baroreceptors control plasma vasopressin responses to graded hypotension in conscious dogs*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **278**(2): p. R469-475.
2. Thrasher, T.N. and L.C. Keil, *Systolic pressure predicts plasma vasopressin responses to hemorrhage and vena caval constriction in dogs*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **279**(3): p. R1035-1042.
3. Dampney, R.A., *Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system*. Physiol Rev, 1994. **74**(2): p. 323-64.
4. Lanfranchi, P.A. and V.K. Somers, *Arterial baroreflex function and cardiovascular variability: interactions and implications*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **283**(4): p. R815-826.
5. Yates, R.D. and I. Chen, *An electron microscopic study of the baroreceptors in the internal carotid artery of the spontaneously hypertensive rat*. Cell Tissue Res, 1980. **205**(3): p. 473-83.
6. Cyon, E.L., C, *Die reflexe eines der sensiblen nerven des herzens auf die motorischen der blutgefäße*. . Arbeit Physiol Anstaltz, 1866(128-150).
7. Sapru, H.N.G., E; Krieger, A.J., *Aortic nerve stimulation in the rat: cardiovascular and respiratory responses*. . Brain Res. Bull., 1981. **6**: p. 393–398.
8. Sapru, H.N.K., A.J. , *Carotid and aortic chemoreceptor function in the rat*. . J. Appl. Physiol., 1977. **42**: p. 344–348.
9. Cheng, Z., et al., *A laser confocal microscopic study of vagal afferent innervation of rat aortic arch: Chemoreceptors as well as baroreceptors*. Journal of the Autonomic Nervous System, 1997. **67**(1-2): p. 1-14.

10. Hansen, J.T., *Innervation of the rat aortic (subclavian) body: An ultrastructural study following axonal degeneration*. Journal of Ultrastructure Research, 1981. **74**(1): p. 83-94.
11. McDonald, D.M. and R.W. Blewett, *Location and size of carotid body-like organs (paraganglia) revealed in rats by the permeability of blood vessels to Evans blue dye*. Journal of Neurocytology, 1981. **10**(4): p. 607-643.
12. Brophy, S., et al., *Activity of aortic chemoreceptors in the anaesthetized rat*. The Journal of Physiology, 1999. **514**(3): p. 821-828.
13. Kobayashi, M., et al., *Is the aortic depressor nerve involved in arterial chemoreflexes in rats?* Journal of the Autonomic Nervous System, 1999. **78**(1): p. 38-48.
14. Dworkin, B.R., S. Dworkin, and X. Tang, *Carotid and aortic baroreflexes of the rat: I. Open-loop steady-state properties and blood pressure variability*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **279**(5): p. R1910-1921.
15. Dworkin, B.R., et al., *Carotid and aortic baroreflexes of the rat: II. Open-loop frequency response and the blood pressure spectrum*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **279**(5): p. R1922-1933.
16. Fan, W., P.J. Reynolds, and M.C. Andresen, *Baroreflex frequency-response characteristics to aortic depressor and carotid sinus nerve stimulation in rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 1996. **271**(6): p. H2218-2227.
17. Constantine, J.W., W.K. McShane, and S.C. Wang, *Comparison of carotid artery occlusion and tilt responses in dogs*. Am J Physiol, 1971. **221**(6): p. 1681-1685.
18. Goldstein, D.S., et al., *Sympathetic Cardioneuropathy in Dysautonomias*. N Engl J Med, 1997. **336**(10): p. 696-702.

19. Head, J.A., *Overall Regulation of the Circulation*. Annual Review of Physiology, 1970. **32**(1): p. 289-312.
20. Pickering, T.G., et al., *Effects of Autonomic Blockade on the Baroreflex in Man at Rest and During Exercise*. Circ Res, 1972. **30**(2): p. 177-185.
21. Ikeda, Y., et al., *Neural arc of baroreflex optimizes dynamic pressure regulation in achieving both stability and quickness*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 1996. **271**(3): p. H882-890.
22. Schmidt, R.M., M. Kumada, and K. Sagawa, *Cardiac output and total peripheral resistance in carotid sinus reflex*. Am J Physiol, 1971. **221**(2): p. 480-487.
23. Andersen, M.C. and D.L. Kunze, *Nucleus Tractus Solitarius-Gateway to Neural Circulatory Control*. Annual Review of Physiology, 1994. **56**(1): p. 93-116.
24. Ciriello, J. and F.R. Calaresu, *Projections from buffer nerves to the nucleus of the solitary tract: an anatomical and electrophysiological study in the cat*. J Auton Nerv Syst, 1981. **3**(2-4): p. 299-310.
25. Donoghue, S., et al., *The central projections of carotid baroreceptors and chemoreceptors in the cat: a neurophysiological study*. J Physiol, 1984. **347**: p. 397-409.
26. Miura, M., K. Takayama, and J. Okada, *Neuronal expression of Fos protein in the rat brain after baroreceptor stimulation*. J Auton Nerv Syst, 1994. **50**(1): p. 31-43.
27. Spyer, K.M., *Neural organisation and control of the baroreceptor reflex*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1981. **88**: p. 24-124.

28. Sleight, P.E., DL, *Human Baroreflexes in Health and Disease*, Oxford Clarendon. 1992.
29. Ketch, T., et al., *Four Faces of Baroreflex Failure: Hypertensive Crisis, Volatile Hypertension, Orthostatic Tachycardia, and Malignant Vagotonia*. *Circulation*, 2002. **105**(21): p. 2518-2523.
30. Low, P.A., et al., *The Sympathetic Nervous System in Diabetic Neuropathy: A Clinical and Pathological Study*. *Brain*, 1975. **98**(3): p. 341-356.
31. Hicks, K.K., et al., *Effects of streptozotocin-induced diabetes on heart rate, blood pressure and cardiac autonomic nervous control*. *J Auton Nerv Syst*, 1998. **69**(1): p. 21-30.
32. Heusser, K., et al., *Baroreflex Failure*. *Hypertension*, 2005. **45**(5): p. 834-839.
33. do Carmo, J.M., et al., *Aortic depressor nerve function examined in diabetic rats by means of two different approaches*. *J Neurosci Methods*, 2007. **161**(1): p. 17-22.
34. Fazan, R., Jr., et al., *Heart Rate Variability and Baroreceptor Function in Chronic Diabetic Rats*. *Hypertension*, 1997. **30**(3): p. 632-635.
35. Fazan, V.P.S., H.C. Salgado, and A.A. Barreira, *Aortic Depressor Nerve Myelinated Fibers in Acute and Chronic Experimental Diabetes*. *American Journal of Hypertension*, 2006. **19**(2): p. 153-160.
36. Salgado, H.C., et al., *Arterial Baroreceptors and Experimental Diabetes*. *Ann NY Acad Sci*, 2001. **940**(1): p. 20-27.
37. Fazan, V.P., H.C. Salgado, and A.A. Barreira, *Aortic depressor nerve unmyelinated fibers in spontaneously hypertensive rats*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **280**(4): p. H1560-4.

38. Zhang, J. and S.W. Mifflin, *Integration of aortic nerve inputs in hypertensive rats*. Hypertension, 2000. **35**(1 Pt 2): p. 430-6.
39. Kunze, D.A., MC . , *Arterial baroreceptors: Excitation and modulation*. In: Zucker IH & Gilmore JP (Editors), *Reflex Control of the Circulation*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 1991: p. 141-166.
40. Thoren, P., W.R. Saum, and A.M. Brown, *Characteristics of rat aortic baroreceptors with nonmedullated afferent nerve fibers*. Circ Res, 1977. **40**(3): p. 231-7.
41. Thoren, P., M.C. Andresen, and A.M. Brown, *Effects of changes in extracellular ionic concentrations on aortic baroreceptors with nonmyelinated afferent fibers*. Circ Res, 1982. **50**(3): p. 413-8.
42. Yao, T. and P. Thoren, *Characteristics of brachiocephalic and carotid sinus baroreceptors with non-medullated afferents in rabbit*. Acta Physiol Scand, 1983. **117**(1): p. 1-8.
43. Thoren, P. and J.V. Jones, *Characteristics of aortic baroreceptor C-fibres in the rabbit*. Acta Physiol Scand, 1977. **99**(4): p. 448-56.
44. Thoren, P., P.A. Munch, and A.M. Brown, *Mechanisms for activation of aortic baroreceptor C-fibres in rabbits and rats*. Acta Physiol Scand, 1999. **166**(3): p. 167-74.
45. Tang, X. and B.R. Dworkin, *Baroreflexes of the Rat V: Tetanus Induced Potentiation of ADN A-fiber Responses at the NTS*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007: p. 00143.2007.
46. Scheuer, D.A., et al., *Temporal processing of aortic nerve evoked activity in the nucleus of the solitary tract*. J Neurophysiol, 1996. **76**(6): p. 3750-7.

47. Angell-James, J., *The responses of aortic arch and right subclavian baroreceptors to changes of non-pulsatile pressure and their modification by hypothermia*. J Physiol (Lond), 1971. **214**: p. 201-223.
48. Pelletier, C.C., DL; Shepherd, JT, *Comparison of afferent activity of canine aortic and sinus nerves*. . Circ Res, 1972. **31**: p. 557-568.
49. Brown, A.S., WR; Tuley, FH, *A comparison of aortic baroreceptor discharge in normotensive and spontaneously hypertensive rats*. Circ Res 1976. **39**: p. 488-496.
50. Burke, S.D., PK; Korner, PI, *Rapid Resetting of Rabbit Aortic Baroreceptors and Reflex Heart Rate Responses by Directional Changes in Blood Pressure*. J. Physiol, 1986. **378**: p. 391-402.
51. Hillyard SA, M.T., Neville HJ *Visual-spatial attention, orienting and brain physiology*. In: *Attention and performance. XI. Mechanisms of attention (Posner MI, Marin OS, eds)*, Hillsdale, NJ: Erlbaum. 1985: p. 63-84.
52. Vaughan Jr, H.G.A., J.C., *The neural basis of event-related potentials*. In: T.W. Picton, Editor, *Human Event-Related Potentials*. 1988. **3**: p. 45-94.
53. Schroeder, C.E., et al., *Localization of ERP generators and identification of underlying neural processes*. Electroencephalography and clinical neurophysiology. Supplement, 1995. **44**: p. 55-75.
54. Makinen, V., P. May, and H. Tiitinen, *Transient brain responses predict the temporal dynamics of sound detection in humans*. NeuroImage, 2004. **21**(2): p. 701-706.
55. Makinen, V., H. Tiitinen, and P. May, *Auditory event-related responses are generated independently of ongoing brain activity*. NeuroImage, 2005. **24**(4): p. 961-968.

56. Nishida, S., M. Nakamura, and H. Shibasaki, *Method for single-trial recording of somatosensory evoked potentials*. J Biomed Eng, 1993. **15**(3): p. 257-62.
57. Thijssen, J.M. and M.H. Cuypers, *Improving the ensemble average of visual evoked potentials. I. Theory of correction by spectral phase difference methods*. Technol Health Care, 1995. **3**(1): p. 23-31.
58. Sammut, R., et al., *The origin of the soleus late response evoked by magnetic stimulation of human motor cortex*. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1995. **97**(3): p. 164-8.
59. Truccolo, W.A., et al., *Trial-to-trial variability of cortical evoked responses: implications for the analysis of functional connectivity*. Clin Neurophysiol, 2002. **113**(2): p. 206-26.
60. Gibbons, H. and J. Stahl, *Response-time corrected averaging of event-related potentials*. Clin Neurophysiol, 2007. **118**(1): p. 197-208.
61. Rodriguez, E., et al., *Perception's shadow: long-distance synchronization of human brain activity*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 430-3.
62. Srinivasan, R., et al., *Increased synchronization of neuromagnetic responses during conscious perception*. J Neurosci, 1999. **19**(13): p. 5435-48.
63. Tallon-Baudry, C., et al., *Induced gamma-band activity during the delay of a visual short-term memory task in humans*. J Neurosci, 1998. **18**(11): p. 4244-54.
64. Roth, A., et al., *Increased event-related potential latency and amplitude variability in schizophrenia detected through wavelet-based single trial analysis*. Int J Psychophysiol, 2007.
65. Padua, L., et al., *SFEMG in ocular myasthenia gravis diagnosis*. Clin Neurophysiol, 2000. **111**(7): p. 1203-7.

66. Dawson, G.D., *A summing technique for detecting small signals in a large irregular background*. J. Neurophysiol, 1951. **115**: p. 2-3.
67. Dawson, G.D., *A summation technique for the detection of small evoked potentials*. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol, 1954. **6**: p. 65-84.
68. Moraes, M.F.D. and N. Garcia-Cairasco, *Real time mapping of rat midbrain neural circuitry using auditory evoked potentials*. Hearing Research, 2001. **161**(1-2): p. 35-44.
69. Woody, V.D., *Characterization of an adaptive filter for the analysis of variable latency neuroelectric signals*. Med Biol Engin 1967. **5**: p. 539-53
70. Fazan, V.P., H.C. Salgado, and A.A. Barreira, *A descriptive and quantitative light and electron microscopy study of the aortic depressor nerve in normotensive rats*. Hypertension, 1997. **30**(3 Pt 2): p. 693-8.
71. McCubbin, J.W.M., G.M.C; Page, I.H., *Aortic depressor nerve of the rat*. . Arch Int Pharmacodyn 1958. **114**: p. 303-306.
72. Jain, A.M., MN; Flynn, PJ, *Data Clustering: A Review*. ACM Computing Surveys, 1999. **31**(3).
73. McCubbin, J.W., J.H. Green, and I.H. Page, *Baroreceptor Function in Chronic Renal Hypertension*. Circ Res, 1956. **4**(2): p. 205-210.
74. Fan, W., J.H. Schild, and M.C. Andresen, *Graded and dynamic reflex summation of myelinated and unmyelinated rat aortic baroreceptors*. Am J Physiol, 1999. **277**(3 Pt 2): p. R748-56.
75. Liu, Z., C.Y. Chen, and A.C. Bonham, *Frequency limits on aortic baroreceptor input to nucleus tractus solitarii*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(2): p. H577-85.

76. Mifflin, S.W. and R.B. Felder, *An intracellular study of time-dependent cardiovascular afferent interactions in nucleus tractus solitarius*. J Neurophysiol, 1988. **59**(6): p. 1798-1813.
77. Seller, H.I., M, *The localization of the first synapse in the carotid sinus baroreceptor reflex pathway and its alteration of the afferent input*. . Pflügers Arch 1968. **306**: p. 1-19.
78. Seagard, J.V.B., JFM; Dean, C; Hopp, FA; Gallenberg, LA; Kampine, JP, *Firing characteristics of single-fiber carotid sinus baroreceptors*. Circ. Res., 1990(66): p. 1499–1509.
79. Reynolds, P.J., W. Fan, and M.C. Andresen, *Capsaicin-resistant arterial baroreceptors*. J Negat Results Biomed, 2006. **5**: p. 6.
80. Eckberg, D.L., *Baroreflex inhibition of the human sinus node: importance of stimulus intensity, duration, and rate of pressure change*. J Physiol. , 1977. **269** (3): p. 561–577.
81. MacQueen, J.B., *Some Methods for classification and Analysis of Multivariate Observations*. Proceedings of 5-th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability. Berkeley, University of California Press, 1967. **1**: p. 281-297
82. Harris, K.D., et al., *Accuracy of tetrode spike separation as determined by simultaneous intracellular and extracellular measurements*. J Neurophysiol, 2000. **84**(1): p. 401-14.

9. CERTIFICAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL (CETEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº **084/05** relativo ao projeto intitulado: "**Análise funcional das aferências barorreceptoras do meio da técnica de potenciais evocados sincrônicos com complexo QRS em ratos anestesiados**", que tem como responsável Márcio Flávio Dutra Moraes, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado em reunião de **15.07.2005**.

Este certificado expira-se em **15.07.2010**

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **084/05** related to the project entitled "**Functional analysis of the baroreceptors aferences by using evocated potencial, synchronous with QRS complex, in anestezised rats**", under the supervision Márcio Flávio Dutra Moraes, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)** and was approved in **15.07.2005**.

This certificate expires in **15.07.2010**.

Belo Horizonte, 15 de julho de 2005


Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE
PRESIDENTE DO CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais -Reitoria – Campus Pampulha
Avenida Antônio Carlos 6627-7 Andar CEP: 31270-901 - Belo Horizonte MG-Brasil
Telefone: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4027 – Home page: [www. ufmg.br/prpq/cetea](http://www.ufmg.br/prpq/cetea)-
Email – cetea@prpq.ufmg.br

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)