



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

Raphael Santos do Nascimento

**METODOLOGIA PARA ANÁLISE DA REGULAÇÃO AUTONÔMICA EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO EM
RATOS**

Florianópolis
2020

Raphael Santos do Nascimento

**METODOLOGIA PARA ANÁLISE DA REGULAÇÃO AUTONÔMICA EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO EM
RATOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica.

Orientador: Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, PhD.
Coorientador: Prof. Fernando da Silva Fiorin, Dr.

Florianópolis
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Nascimento, Raphael Santos do
METODOLOGIA PARA ANÁLISE DA REGULAÇÃO AUTONÔMICA EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE TRAUMATISMO CRÂNIOENCEFÁLICO EM
RATOS / Raphael Santos do Nascimento ; orientador,
Jefferson Luiz Brum Marques, coorientador, Fernando da
Silva Fiorin, 2020.
92 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Elétrica, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia Elétrica. 2. Traumatismo
Cranioencefálico. 3. Modelo de Lesão por Percussão de
Fluido. 4. Variabilidade da Frequência Cardíaca. 5. Sistema
Nervoso Autônomo. I. Marques, Jefferson Luiz Brum. II.
Fiorin, Fernando da Silva. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Elétrica. IV. Título.

RAPHAEL SANTOS DO NASCIMENTO
**METODOLOGIA PARA ANÁLISE DA REGULAÇÃO AUTONÔMICA EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO EM
RATOS**

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

Profa. Caroline Cunha do Espírito Santo, Dra.
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Profa. Daniela Ota Suzuki, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Luiz Fernando Freire Royes, Dr.
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão
que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Engenharia Elétrica
pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica-UFSC.

Prof. Telles Brunelli Lazzarin, Dr.
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica-UFSC

Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, Ph.D.
Orientador

Florianópolis, 2020.

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Evanildo Muniz do Nascimento e Vaneide Santos do Nascimento por sempre incentivarem eu e meus irmãos a estudar, apesar de todas as barreiras e dificuldades impostas pela vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me ajudar a vencer todas as provas em que foram apresentadas durante todo o percurso da vida, pois sem Ele nada disso seria possível.

À minha família, em especial meus pais Vaneide Santos do Nascimento e Evanildo Muniz do Nascimento, pelas inúmeras orações, pelos valores e educação que me deram, por todo o carinho, amor e apoio incondicional, que por vezes deixaram seus próprios desejos de lado para concretizar minhas realizações e mesmo muito distantes, nunca mediram esforços para que eu pudesse estar aqui neste momento. Obrigado por tudo, amo vocês.

À minha querida irmã Leticia Santos, por sempre torcer pelas minhas conquistas, por sempre me apoiar, e me ajudar em todos os momentos difíceis da minha vida, mesmo muito distante, obrigado por tudo, te amo preta.

Ao meu querido irmão Wellinton Muniz, por todos esses anos compartilhados juntos sobre o mesmo teto, por todos os conselhos, por ter me guiado no âmbito acadêmico, por todo o apoio e parceria, pelas brigas e reconciliações, por todo o amor e por todo o suporte que tem me dado desde o início da minha caminhada na vida acadêmica, obrigado por tudo meu irmão, eu te amo.

Às minhas amadas avós, Rosa Purcina pelas numerosas orações e pedidos por mim feito e por todo o apoio e Lurde Santos por toda sua alegria contagiante e torcida por minhas conquistas, amo vocês.

Gostaria de agradecer também aos grandes amigos que fiz desde minha chegada à Florianópolis, em especial, Sadrack, João, Richard e Yuri, por todos os momentos de alegrias, pelas confraternizações, pelos cultos, bem como por toda a diversão, muito obrigado pessoal.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Jefferson Luiz Brum Marques, primeiramente pela oportunidade concedida de orientação, por todos os ensinamentos, conversas e reuniões que por vezes constituíram uma aula à parte, por toda a paciência e calma em solucionar minhas dúvidas e problemas, e por ser essa humildade em pessoa, foi gratificante seguir os seus passos, obrigado por tudo professor.

Agradeço também ao meu coorientador Prof. Dr. Fernando da Silva Fiorin, por toda a contribuição no trabalho, especialmente pelo auxílio com os animais e

aprendizado no laboratório, pelas inúmeras conversas e ideias científicas e pela grande amizade construída, obrigado por tudo parceiro.

Agradeço a todos os colegas que fiz na pós-graduação, em especial Reginaldo, Yukimi, Luiz, Rosana, Eduardo, Anderson e Flávio, por todo o auxílio concedido a este estudo.

Aproveito para agradecer a todos os professores e funcionários do Instituto de Engenharia Biomédica, por disponibilizarem seus conhecimentos para minha formação de mestrando.

E por fim, gostaria de agradecer a Universidade Federal de Santa Catarina e ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico por todo o suporte.

“Quando a vida decepciona, qual é a solução?

Continue a nadar! Continue a nadar!

Continue a nadar, nadar, nadar!

Para achar a solução, nadar, nadar!”

(WALTERS, GRAHAM; **PROCURANDO NEMO**, 2003.)

RESUMO

O traumatismo cranioencefálico (TCE) consiste em qualquer lesão cerebral traumática que acarrete lesão anatômica ou comprometimento funcional do cérebro. Embora o TCE seja uma lesão na cabeça, diversos estudos clínicos tem reportado mudanças nas atividades do sistema nervoso autônomo (SNA) por meio de métricas da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) advinda do registro e análise do eletrocardiograma (ECG). No entanto, em modelos experimentais de TCE com ratos, este processo ainda permanece pouco conhecido, devido à dificuldade para a mensuração do ECG nestes animais. Neste sentido, o presente estudo descreve uma nova abordagem para o registro do ECG em ratos no estado de vigília, tanto em parâmetros de sistema quanto de metodologia, para investigar as principais componentes da VFC após TCE moderado. A avaliação foi realizada antes e após 24, 48 e 72 horas pós lesão traumática. Adicionalmente, são fornecidas informações sobre o uso da administração de isoflurano para mensuração do ECG sobre os animais. A análise estatística basal entre os animais acordados e anestesiados revelou que o uso do anestésico isoflurano interfere sobre os índices lineares no domínio do tempo e da frequência da VFC, bem como nos índices não lineares ($p < 0,05$). Os resultados obtidos sobre os ratos anestesiados pós-TCE, não foram estatisticamente significantes sobre nenhum índice global da VFC ($p > 0,05$). Por outro lado, os parâmetros que refletem as atividades simpática ($p < 0,01$), parassimpática ($p < 0,05$) e do balanço simpático-vagal ($p < 0,01$), demonstraram ativação em estado anestesiado. Na avaliação dos animais em estado acordado pós-TCE, este estudo apontou menor atividade sobre os parâmetros parassimpático ($p < 0,05$) e de VFC global ($p < 0,05$) e maior atividade sobre as métricas de atividade simpática ($p < 0,01$) e do balanço simpático-vagal ($p < 0,05$). Os resultados apresentados sobre o comportamento do SNA demonstraram claramente que o TCE de moderada gravidade induzido sobre os ratos, compromete a regulação do SNA. Além disso, este estudo mostrou que a administração de anestesia por isoflurano compromete a avaliação dos parâmetros da VFC em ratos, implicando uma melhor abordagem translacional do que ocorre de fato na clínica. Portanto, o desenvolvimento do sistema unido a nova abordagem metodológica para o registro do ECG em ratos acordados demonstrou ser uma solução relevante para o entendimento da patofisiologia pós-TCE.

Palavras-chave: Traumatismo cranioencefálico. Modelo de lesão por percussão de fluido. Variabilidade da frequência cardíaca. Sistema nervoso autônomo. Eletrocardiograma. Isoflurano.

ABSTRACT

Traumatic brain injury (TBI) consists of any traumatic lesion that causes anatomical injury or functional impairment of the brain. Although the TBI is an injury in the head, several clinical studies have reported changes in the autonomic nervous system (ANS) activities, assessed through the heart rate variability (HRV) metrics from electrocardiogram (ECG) recording and analysis. However, in experimental TBI models with rats, this process is not completely understood due to the difficulty of ECG measurement on the animals. In this sense, the present study describes a new approach for the ECG recording in rats in the awake state, including the instrumentation and methodology, to investigate the main components of HRV following moderate TBI. The evaluation was performed before and after 24, 48 and 72 hours after traumatic brain injury. Additionally, information is provided on the use of isoflurane administration in the ECG recording on the animals. Baseline statistical analysis between awake and anaesthetised animals revealed that the use of the isoflurane anaesthetic interferes on the HRV linear indexes in the time and frequency domain, as well as the non-linear indexes ($p < 0.05$). The results obtained on the anaesthetised rats post-TBI were not statistically significant on any global HRV index ($p > 0.05$). On the other hand, the parameters reflecting sympathetic ($p < 0.01$), parasympathetic ($p < 0.05$) and the sympathetic-vagal balance activities ($p < 0.01$), demonstrated activation in the anaesthetised state. In the evaluation of awake animals post-TBI, this study pointed out a lower activity on the parameters parasympathetic ($p < 0.05$) and the HRV global ($p < 0.05$) and higher activity on the sympathetic metrics ($p < 0.01$) and the sympathetic-vagal balance ($p < 0.05$). The findings related to the ANS behaviour, clearly demonstrated that moderate TBI induced on the rats compromises the ANS regulation. Also, this study showed that the anaesthesia due to administration of isoflurane compromises the assessment of HRV parameters in rats, implying on a better translational approach to what occurs effectively in the clinical setting. Therefore, the development of the instrumentation system associated with the new methodological approach for ECG recording in awake rats indicated to be a relevant solution for understanding the pathophysiology post-TBI.

Key-words: Traumatic brain injury. Fluid percussion injury model. Heart rate variability. Autonomic nervous system. Electrocardiogram. Isoflurane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Parâmetros de pontuação na Escala de Coma de Glasgow.....	30
Figura 2 - Modelo de traumatismo cranioencefálico de lesão por percussão de fluido.....	33
Figura 3 - Diagrama de representação do TCE, resultando em desregulação do SNA e manifestações de sintomas clínicos.....	37
Figura 4 - Representação da divisão do SNA simpático e parassimpático.....	40
Figura 5 - Ilustração do sistema cardiovascular de um rato.....	42
Figura 6 - Espectro de potência representativo da VFC em um rato, utilizando FFT. As bandas VLF, LF e HF são representadas.....	45
Figura 7 - Sistema de registro eletrocardiográfico em ratos por contenção.....	47
Figura 8 - Representação de ratos Wistars em estado anestesiado sobre administração (A) inalável e (B) injetável.....	49
Figura 9 - Sistema de registro do ECG em ratos pela abordagem da telemetria.....	50
Figura 10 - Representação geral do sistema de registro do ECG para mensuramento no estado anestesiado e acordado.....	52
Figura 11 - Jaqueta personalizada para a aquisição do sinal de ECG no animal na condição acordado.....	53
Figura 12 - Linha do tempo do protocolo experimental desenvolvido para o mensuramento do ECG em ratos após o TCE de moderada gravidade.....	54
Figura 13 - Diagrama de bloco geral do sistema para o registro do ECG em ratos.....	55
Figura 14 - Circuito esquemático geral do bloco de condicionamento do sinal.....	57
Figura 15 - Conversor ADS1015.....	58
Figura 16 - Esquemático geral do circuito de alimentação do sistema.....	59
Figura 17 - Sistema de registro do ECG em ratos desenvolvido em PCI.....	63
Figura 18 - Versão final do sistema de registro do ECG em ratos desenvolvido.....	64
Figura 19 - Cenário de adaptação e aquisição do sinal do ECG.....	65

Figura 20 - Representação do sinal de ECG no domínio do tempo e da frequência de um mesmo animal no estado basal.....	67
Figura 21 - O efeito do procedimento cirúrgico e TCE sobre os parâmetros lineares da VFC no domínio do tempo sobre os animais em estado (A) anestesiado e (B) acordado.....	69
Figura 22 - O efeito do procedimento cirúrgico e TCE sobre os parâmetros lineares da VFC no domínio do tempo sobre os animais em estado (A-C) anestesiado e (B-D) acordado.....	70
Figura 23 - O efeito do procedimento cirúrgico e TCE sobre os parâmetros não lineares da VFC no domínio do tempo sobre os animais em estado (A, C e E) anestesiado e (B, D e F) acordado.....	71
Figura 24 - O efeito do procedimento cirúrgico e TCE sobre os parâmetros lineares da VFC no domínio da frequência sobre os animais em estado (A, C e E) anestesiado e (B, D e F) acordado.....	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação Tomográfica de Marshall.....	31
Quadro 2 - Principais parâmetros lineares e não lineares da VFC descritas no domínio do tempo.....	44
Quadro 3 - Principais parâmetros lineares da VFC descritas no domínio da frequência.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais características da plataforma Arduino Nano.....	58
Tabela 2 - Correlação dos parâmetros da VFC.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/D - Analógico-Digital
ANOVA - Análise de Variância
ATM - Atmosfera
BHE - Barreira Hematoencefálica
BPM - Batimentos por Minuto
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CI - Circuito Integrado
cm - centímetros
CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DATASUS - Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
ECG - Eletrocardiograma
EEG - Eletroencefalograma
EUA - Estados Unidos da América
FC - Frequência Cardíaca
FFT - Transformada Rápida de Fourier
LPF - Lesão por Percussão de Fluido
FSC - Fluxo Sanguíneo Cerebral
GCS - Escala de Coma de Glasgow
HF - Alta Frequência
Hz – Hertz
IEB-UFSC – Instituto de Engenharia Biomédica da UFSC
LAD - Lesão Axonal Difusa
LF - Baixa Frequência
mm - milímetros
ms - Milissegundos
nu - Unidade Normalizada
OMS - Organização Mundial da Saúde
PCI - Placa de Circuito Impresso
APT - Amnésia Pós-Traumática
PWM - Modulação por Largura de Pulso
SNA - Sistema Nervoso Autônomo
SNC - Sistema Nervoso Central
SNP - Sistema Nervoso Parassimpático
SNS - Sistema Nervoso Simpático
TC - Tomografia Computadorizada
TCE - Traumatismo Cranioencefálico
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
USB - Conexão por Porta Universal
VFC - Variabilidade da Frequência Cardíaca
VLF - Muito Baixa Frequência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.2.	OBJETIVOS.....	26
1.2.1	Objetivo Geral.....	26
1.2.2	Objetivos Específicos.....	26
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	27
2.1	TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO.....	27
2.1.1	Definição de TCE.....	27
2.1.2	Panorama Epidemiológico.....	27
2.1.3	Classificação do TCE.....	29
2.1.4	Modelos Experimentais do TCE.....	32
2.1.5	Fisiopatologia do TCE.....	34
2.1.5.1	SNA e TCE.....	37
2.2	SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO.....	39
2.2.1	Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	41
2.2.1.1	<i>Análise no Domínio do Tempo.....</i>	<i>43</i>
2.2.1.2	<i>Análise no Domínio da Frequência.....</i>	<i>44</i>
2.2.2	Eletrocardiograma em Ratos.....	46
2.2.2.1	<i>Tipos de Sistemas de Registro do ECG em Ratos.....</i>	<i>47</i>
2.2.2.1.1	Contenção.....	47
2.2.2.1.2	Anestesia.....	48
2.2.2.1.3	Telemetria.....	50
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1	ANIMAIS.....	51
3.2	PROTOCOLO DE AQUISIÇÃO DE DADOS.....	51
3.3	ARQUITETURA DO SISTEMA DE REGISTRO DO ECG.....	55
3.3.1	Sistema Geral.....	55
3.3.1.1	<i>Circuitos de Condicionamento do Sinal.....</i>	<i>55</i>
3.3.1.2	<i>Conversão dos Dados.....</i>	<i>57</i>
3.3.1.3	<i>Transmissão dos Dados.....</i>	<i>58</i>
3.3.1.4	<i>Circuito da Fonte de Alimentação.....</i>	<i>59</i>
3.4	TCE INDUZIDO PELO MODELO DE LPF PARASSAGITAL...60	

3.5	ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	61
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
4	RESULTADOS.....	62
4.1	SISTEMA DE REGISTRO DO ECG.....	62
4.2	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ANESTESIA POR ISOFLURANO SOBRE OS PARÂMETROS DA VFC.....	65
4.3	EFEITO DO IMPACTO DO TCE MODERADO SOBRE OS ANIMAIS EM ESTADO ANESTESIADO E ACORDADO.....	68
5	DISCUSSÃO.....	75
6	CONCLUSÃO.....	82
7	TRABALHOS FUTUROS.....	83
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

1 INTRODUÇÃO

O traumatismo cranioencefálico (TCE) é definido como qualquer agressão traumática, resultante de energia mecânica sobre o encéfalo a partir de forças físicas externas. Este representa um problema crítico de saúde pública da qual implica sobre forte impacto social e econômico em todo o mundo. Estima-se que aproximadamente 10 milhões de pessoas sejam afetadas anualmente pelo TCE, tornando-se uma das principais causas de mortalidade, morbidade e incapacidades neurológicas em populações adultas civis, atletas de vários esportes, pediátricos, militares, bem como em veteranos de guerra (LUCAS, 2011; RUFF; RIECHERS, 2012). O TCE é classificado por meio da Escala de Coma de Glasgow (GCS) (KRAUS; MCARTHUR, 2000), em três níveis: leve, moderado e grave. Atualmente, o TCE moderado é responsável por aproximadamente 11,04% de todos os casos, enquanto que o TCE leve e grave corresponde por outros 81,02% e 7,95%, respectivamente (DEWAN et al., 2018). Embora seja uma lesão cerebral, o TCE também resulta em uma variedade de déficits neurofisiológicos, tais como choque cardiogênico e edema pulmonar (GREGORY; SMITH, 2012).

Do ponto de vista clínico, os danos primários e secundários do TCE estão relatados em grande quantidade na literatura. Por outro lado, o impacto das complicações sistêmicas subjacentes a estes danos ainda é pouco compreendido. Neste contexto, compreende-se que 89% dos pacientes que sofrem por TCE moderado-grave, desencadeiam significativa disfunção de órgãos sistêmicos. A incidência de disfunção entre os órgãos após TCE é diversificada e envolve particularmente os sistemas cardiovascular, respiratório, coagulação, renal e hepático. Dentre as desregulações sistêmicas após TCE, o sistema cardiovascular é um dos que ocorre com maior incidência, atingindo cerca de 52% dos pacientes acometidos em longo prazo (ZYGUN et al., 2005). A principal causa de disfunção deste sistema está ligado a mudanças na função autônoma cardiovascular ou disautonomia como é conhecida na literatura, a qual atinge aproximadamente 15% dos pacientes em lesões mais severas (BAGULEY et al., 2006).

A disfunção da função autonômica cardíaca está associada a alterações nas atividades simpática e parassimpática do sistema nervoso autônomo (SNA). O SNA em geral modula continuamente o ritmo do coração em resposta as variações de pressão sanguínea, respiração, termorregulação e ciclo circadiano, estabelecendo a

fisiologia natural do órgão (JARRIN et al., 2015; MCCORRY, 2007). Este pode ser avaliado através da análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), que é um marcador não invasivo da modulação autonômica da frequência cardíaca em repouso ou em exercício agudo, derivado de registros do eletrocardiograma (ECG), que também é um método indireto para avaliação do equilíbrio das vias do SNA (JARRIN et al., 2015). Deste modo, a VFC fornece informações sobre as atividades do ramo simpático e parassimpático do SNA, refletindo desequilíbrios de níveis de estresse psicológico e fisiológico. Assim, as alterações na modulação simpática e parassimpática da frequência cardíaca são indicativos iniciais de disautonomia (ZHENG; MORITANI, 2008).

Nesta perspectiva, estudos anteriores investigados em pacientes com histórico de TCE leve, apontaram baixa modulação cardíaca no estado de repouso, demonstrando diminuição das atividades parassimpáticas em comparação com as atividades simpáticas. Entretanto, quando investigadas durante o desafio ortostático (transição da posição supino para a posição em pé) os resultados revelaram baixa modulação tanto em atividades simpáticas mediadas por barorreflexo quanto por atividades parassimpáticas (HILZ et al., 2011; HILZ et al., 2015). Também foram encontradas mudanças em análise do traçado do ECG em pacientes com TCE leve, induzindo baixa amplitude e baixa ritmicidade sobre a variabilidade dos sinais eletrocardiográficos registrados (THOMPSON; HAGEDORN, 2012). Em modelos de TCE leve explorados em ratos, os animais refletiram baixa frequência cardíaca durante as primeiras 6 e 12 horas após o trauma (GRIESBACH et al., 2013; UMEMOTO; CHITRAVANSHI, 2017).

Em pacientes de TCE moderado/grave, estudos tem reportado diminuição da VFC evidenciadas pela ativação das atividades simpática e do balanço simpático-vagal nos sinais analisados (HASEN; ALMOJUELA; ZEILER, 2019; HENDRICKS; HEEREN; VOS, 2010; SYKORA et al., 2016). Outro estudo demonstrou que em lesões mais graves, os pacientes com GCS menor que 12 mostraram alta atividade simpática e balanço simpático-vagal inicialmente. No entanto, esta atividade diminuía concomitante ao aumento do dano do tronco encefálico (SU et al., 2005). Estes achados tem sido correlacionados com o aumento significativo de mortalidade em pacientes após graus mais severos de lesões encefálicas, sendo independentes de características tais como idade, pressão intracraniana ou *status* autoregulatório

(SYKORA et al., 2016). Em ratos, foi relatado baixa frequência cardíaca em TCE moderado/grave (UMEMOTO; CHITRAVANSHI, 2017).

Embora diversas investigações demonstrem que o TCE afeta a regulação do sistema nervoso autônomo em todos os graus de lesões sobre os pacientes, em modelos de TCE com ratos, este processo ainda permanece desconhecido. As ferramentas existentes atualmente de registro do ECG em ratos, ainda requerem o uso de procedimentos cirúrgicos (SILVA et al., 2017), administração de anestesia (FENSKE et al., 2016), bem como contenção dos animais (MONGUE-DIN et al., 2007). Todavia, estes são por vezes considerados impraticáveis para análise da atividade das vias do SNA em ratos, em virtude de comprometer uma melhor tradução do que ocorre em pacientes com TCE na clínica. Por exemplo, o uso de diferentes tipos de anestésicos para registro do ECG afeta o sistema cardiovascular natural. Ainda que recentes estudos tenham apresentado que o sistema de telemetria é o padrão mais eficiente para o registro eletrofisiológico em ratos, este ainda possui muitas limitações dentre as principais, um alto custo de implementação e requerimento de energia externa para seu funcionamento (NIEMEYER, 2016).

Portanto, existe uma dificuldade nos dias de hoje incumbido por pesquisadores da área de neurociência e pelas indústrias farmacêuticas em desenvolver soluções para a restauração da capacidade cardiovascular após o TCE, devido à dificuldade de mimetizar e conseqüentemente avaliar o sistema fisiológico na clínica, especificamente em pacientes que não sofreram qualquer tipo de cirurgia ou administração de anestésico. Por esta razão, o uso de sistemas de registros eletrocardiográficos em particular em ratos acordados, pode ser benéfico para o entendimento dos mecanismos não somente do SNA, mas como também de outras fisiopatologias envolvidas, no sistema cardiovascular após lesão cerebral (XIONG; MAHMOOD; CHOPP, 2013).

Neste sentido, visando contribuir para a solução dos problemas apresentados anteriormente, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver uma nova abordagem não invasiva de registro do ECG em ratos em estado acordado, no intuito de investigar o comportamento do SNA após TCE de moderada gravidade, induzido por modelo de lesão por percussão de fluido (LPF), em 24, 48 e 72 horas. Além disso, para testar a eficácia do sistema proposto também foi explorado em conjunto o uso da administração do anestésico isoflurano para estudo comparativo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral:

Desenvolver um método não invasivo de registro e análise do ECG para ratos no estado acordado e caracterizar as métricas de VFC nas condições acordado e anestesiado após TCE.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um protótipo de registro do ECG voltado para as características de ratos, projetando e implementando circuitos eletrônicos para condicionamento, amplificação, digitalização e armazenamento dos sinais de uma derivação.
- Analisar a eficiência do protótipo para mensurar a VFC em ratos acordados.
- Estudar o impacto da anestesia sobre a VFC.
- Estudar os efeitos adversos do TCE sobre a VFC nas condições acordado e anestesiado.
- Elaborar e executar um protocolo experimental para adaptação dos animais na jaqueta de aquisição e preparação para os experimentos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 TRAUMATISMO CRÂNIOENCEFÁLICO

2.1.1 Definição

O TCE tem acometido a humanidade desde o início da civilização. Mundialmente, os mecanismos correlacionados ao TCE estão sendo substituídos de agressões desde a antiguidade para lesões associadas a veículos motores atualmente. O TCE é caracterizado como qualquer agressão traumática, que cause lesão anatômica ou implicação funcional do encéfalo, crânio, meninges, couro cabeludo e seus vasos sanguíneos. Conceitualmente, o TCE pode ser definido como uma lesão sobre o encéfalo decorrente de energia mecânica, a partir de forças físicas de impacto externo (penetrantes ou não), advindas de fenômenos de aceleração e/ou desaceleração. Os fatores resultantes desta patologia podem ser evidenciados por intervenção de um dos sinais clínicos: perda e/ou diminuição dos níveis de consciência, mudanças da função cerebral, déficits neurosensitivos e neuromotores, coma e alteração do estado mental no momento da lesão (*i.e.*, confusão, desorientação, raciocínio lento, etc.) (ALMEIDA *et al.*, 2016; MENON *et al.*, 2010).

2.1.2 Panorama Epidemiológico

Estudos epidemiológicos são indispensáveis para a compreensão do TCE, uma vez que possibilita não apenas visualizar com clareza a magnitude de prevalência e incidência deste evento, mas também contribui para a identificação de melhores abordagens terapêuticas, auxiliando na implementação de estratégias de prevenção e intervenção que sejam de fato efetivas. Deste modo, o reconhecimento dos principais grupos acometidos, bem como do seus principais riscos e consequências para os indivíduos afetados, pode orientar os países nas diretrizes de tratamentos futuros para que obtenham gastos associados ao TCE conseqüentemente mais baixos (BARKER-COLLO; WILDE; FEIGIN, 2009; KUFFLER, 2012).

Neste sentido, o TCE constitui a maior causa de morbidade e mortalidade, correspondendo por quase um terço de todas as mortes no mundo acerca de todos

os tipos de lesões associados ao trauma. Em virtude da sua alta incidência, grande potencial de debilidade e impacto na população economicamente ativa, este tipo de lesão se destaca como uma grave preocupação socioeconômico, tido como uma “epidemia silenciosa”. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 90% das mortes ocorram em países de baixa renda e média, da qual compreende 85% da população mundial e a expectativa é que a situação piore nos próximos anos, tornando-se uma preocupação de grande relevância para a saúde mundial (CAPONNETO; RIZOLI, 2009; KAMAL; AGRAWAL; PANDEY, 2016). Somente em 2013, os Estados Unidos da América (EUA) receberam aproximadamente 2,5 milhões de visitas em seus departamentos de emergências, sendo responsável por uma incidência de TCE de 823,7 para cada 100.000 habitantes. Similarmente, a União Europeia também se encontra em momento alarmante, decorrendo de uma taxa de incidência geral de TCE de 81,0-643,5 admitidos para cada 100,000 habitantes (MAJDAN *et al.*, 2015).

No Brasil e assim como em outros países emergentes, os estudos epidemiológicos sobre o alcance e o impacto do TCE são escassos. No entanto, recente estudo explorado com base nos dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) do Brasil, reportou que entre os anos de 2008 e 2012, os departamentos de emergências receberam aproximadamente 125.000 internações de TCE por ano, resultando em uma incidência de 65,7 internações para cada 100.000 habitantes por ano, da qual a maior parte foi integrada por indivíduos acima de 80 anos, seguida pela faixa etária de 70 a 79 anos. Essas admissões geraram um custo anual de despesas hospitalares de R\$ 156.300.000 para o país (ALMEIDA *et al.*, 2016). Os mecanismos epidemiológicos envolvidos na alta incidência do TCE na população brasileira são relacionados em sua maioria a quedas (35%), acidentes de trânsito (31%) e agressões (8%) (FERNANDES; SILVA, 2013).

Embora os dados analisados do sistema DATASUS sinalizem um cenário de larga escala de impacto socioeconômico no Brasil, ainda é necessário estudos prospectivos que estimem adequadamente a incidência e classificação da causa geral do TCE atualmente, para que políticas de desenvolvimento de prevenção primária possam ser tomadas. Na ampla maioria, os dados especificam apenas microrregiões do país, utilizando diferentes critérios de abordagem, o que compromete a compreensão das lesões como um todo (ALMEIDA *et al.*, 2016; MAGALHÃES *et al.*,

2017). Por esta razão, o horizonte do impacto do TCE causado na população brasileira pode sugerir números ainda maiores em comparação com aqueles evidenciados nos dias de hoje. Isto posto, é sabido que milhões de indivíduos afetados por TCE no mundo todo, permanecem em estado mental e físico alterados, o que implica em uma necessidade de indicadores epidemiológicos mais precisos e robustos que possibilitem traçar cenários para a melhoria da qualidade de vida destas populações.

2.1.3 Classificação do TCE

O TCE é comumente categorizado por meio de um dos três principais sistemas: índices clínicos de gravidade, mecanismos físicos de lesão e avaliação dos danos estruturais (MAAS; STOCCHETTI; BULLOCK, 2008). Com relação a gravidade clínica, o TCE pode ser classificado em leve, moderado e grave conforme a pontuação na Escala de Coma de Glasgow (GCS). Esta escala foi publicada na Revista *The Lancet* em 1974, pelos pesquisadores da Universidade de Glasgow (Escócia), Teasdale e Jennet, como forma prática de mensurar os níveis de consciência dos indivíduos vítimas de TCE. Esta escala permite monitorar os níveis de consciência a partir de métricas clínicas de pontuação, fornecendo medidas quantitativas da severidade do dano estrutural presente. A GCS baseia-se em três índices para avaliação clínica: abertura ocular, resposta verbal e resposta motora. No entanto, os autores salientam que para este marcador tornar-se consistente em refletir o estado clínico do indivíduo, é primordial que a aplicação desta escala seja realizada corretamente (TEASDALE; JENNETT, 1974).

Desta maneira, o GCS tem se tornado um método muito confiável e objetivo, empregado constantemente por profissionais da área da saúde para avaliação do dano neurológico, para acompanhamento dos efeitos de tratamentos e como prognóstico do estado do indivíduo, contribuindo para a predição dos resultados a curto e longo prazo pós-TCE. A GCS compreende um escore de pontuação de 3 a 15, avaliando-as em três categorias clínicas, em que quanto menor for o escore obtido, mais profundo é o coma e conseqüentemente mais grave será o quadro neurológico. As três categorias clínicas devem ser avaliadas de forma independente, atribuindo pontos para cada uma delas conforme as respostas obtidas dos indivíduos. A somatória dos valores obtidos em cada categoria determina a GCS. A estratificação

atribui um escore 13 a 15 pontos a um grau leve, de 9 a 13 um grau moderado e de 3 a 8 um grau grave, de acordo com cada parâmetro estabelecido na Figura 1 (MAAS; STOCCHETTI; BULLOCK, 2008; TEASDALE; JENNETT, 1974).

Figura 1 - Parâmetros de pontuação na Escala de Coma de Glasgow.

Abertura Ocular		Resposta Motora		Resposta Verbal	
4	Espontânea	6	Obedece a comandos	5	Orientado e conversando
3	Ao estímulo verbal	5	Localiza dor	4	Desorientado e conversando
2	Ao estímulo doloroso	4	Retirada ao estímulo doloroso	3	Palavras inapropriadas
1	Ausente	3	Flexão ao estímulo doloroso (postura decorticada)	2	Sons incompreensíveis
		2	Extensão ao estímulo doloroso (postura descerebrada)	1	Ausente
		1	Ausente		

Grave						Moderado					Leve	
3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

Fonte: Adaptado de MAAS; STOCCHETTI; BULLOCK (2008).

Outra forma de avaliar a gravidade do TCE é por meio do tempo de inconsciência do indivíduo e pela duração da amnésia pós-traumática (APT). Neste tipo de avaliação, classifica-se como leve o paciente com perda da consciência de no máximo 30 minutos, como moderado o paciente com tempo de inconsciência superior a 30 minutos (não apresentando perfil de lesão grave) e grave quando o paciente não manifesta resposta de consciência superior a 24 horas após o traumatismo (FREY, 2003). Nesta perspectiva, o prognóstico final da avaliação da gravidade do TCE no paciente pode envolver métodos diretos como a GCS e a APT, estudos de neuroimagem, bem como uma observação do estado do paciente (*i.e.*, convulsão e *etc.*) (MAAS; STOCCHETTI; BULLOCK, 2008).

Considerando os mecanismos físicos de lesão, o TCE pode ser classificado como penetrante ou fechado. O TCE penetrante é identificado como uma lesão em que o parênquima encefálico é comprometido. Os ferimentos penetrantes podem ser causados por projéteis de alta velocidade (*e.g.*, projétil de arma de fogo e/ou

fragmentos) ou objetos de menor velocidade (e.g., arma branca e/ou fragmentos) (VAN-BAALEN *et al.*, 2003). Este tipo de trauma é marcado por danos focais que ocorrem ao longo do trajeto que o objeto percorreu no cérebro, incluindo meninges rasgadas, crânio fraturado/perfurado, bem como diversos outros danos ao tecido cerebral. Embora o TCE penetrante tenha menor incidência (1-2% dos TCEs), normalmente é mais grave e resulta em maiores complicações, o que requer procedimentos cirúrgicos agudos continuamente (DECUYPERE; JR, 2012).

Por outro lado, um TCE fechado é proveniente de um dano cerebral advindo de um impacto indireto (e.g., acidentes automobilísticos, quedas e agressões) sem a entrada de qualquer objeto estranho penetrante no cérebro. Neste tipo de TCE, o crânio pode ou não ser danificado, porém não há penetração sobre a dura-máter. Este pode ser produzido por forças externas de aceleração/desaceleração, promovendo o movimento irrestrito do encéfalo para com o crânio em que leva ao choque de ambos (*i.e.*, mecanismo de golpe e contragolpe). Este processo acarreta o estiramento de vasos sanguíneos e de neurônios, o rompimento de veias-ponte, resultando em sua maioria em hematomas subdural (GENNARELLI; GRAHAM, 2005; SAATMAN *et al.*, 2008).

Quadro 1 – Classificação Tomográfica de Marshall.

Tipo de Lesão	Definição
Lesão Difusa I	Ausência de lesão intracraniana visível na tomografia
Lesão Difusa II	Cisternas presentes, desvio da linha média de 0-5 mm, e/ou lesão densa presente, ausência de lesão de densidade alta ou mista >25ml e inclui fragmentos ósseos e corpos estranhos
Lesão Difusa III (edema)	Cisternas comprimidas ou ausentes, desvio da linha média de 0-5 mm, e ausência de lesão de densidade alta ou mista >25ml
Lesão Difusa IV (desvio)	Desvio da linha média >5 mm e ausência de lesão de densidade alta ou mista >25ml
Lesão de Massa Operável	Qualquer lesão de massa operável
Lesão de Massa não Operável	Lesão alta ou baixa densidade >25ml, não passível de intervenção cirúrgica

Fonte: Adaptado de MARSHALL *et al.* (1991).

Outra maneira de separar os diferentes graus de TCE é pelo dimensionamento dos danos estruturais neurológicos, que pode ser estimada pela escala desenvolvida por Marshall e colaboradores. Esta técnica é baseada em estudos de neuroimagem com tomografia computadorizada (TC), atribuindo presença ou ausência de uma lesão de massa, conforme ilustrado no Quadro 1. Do ponto de vista de lesão de massa, classifica-se o aumento de volume do conteúdo intracraniano (*i.e.*, contusões, edema ou outros). Embora esta escala seja limitada em prever o prognóstico, ela é capaz de diferenciar lesões difusas em que se constitui o aumento da pressão intracraniana (*i.e.*, constrição de cisternas basais e desvio da linha média) (MAAS *et al.*, 2007; MARSHALL *et al.*, 1991).

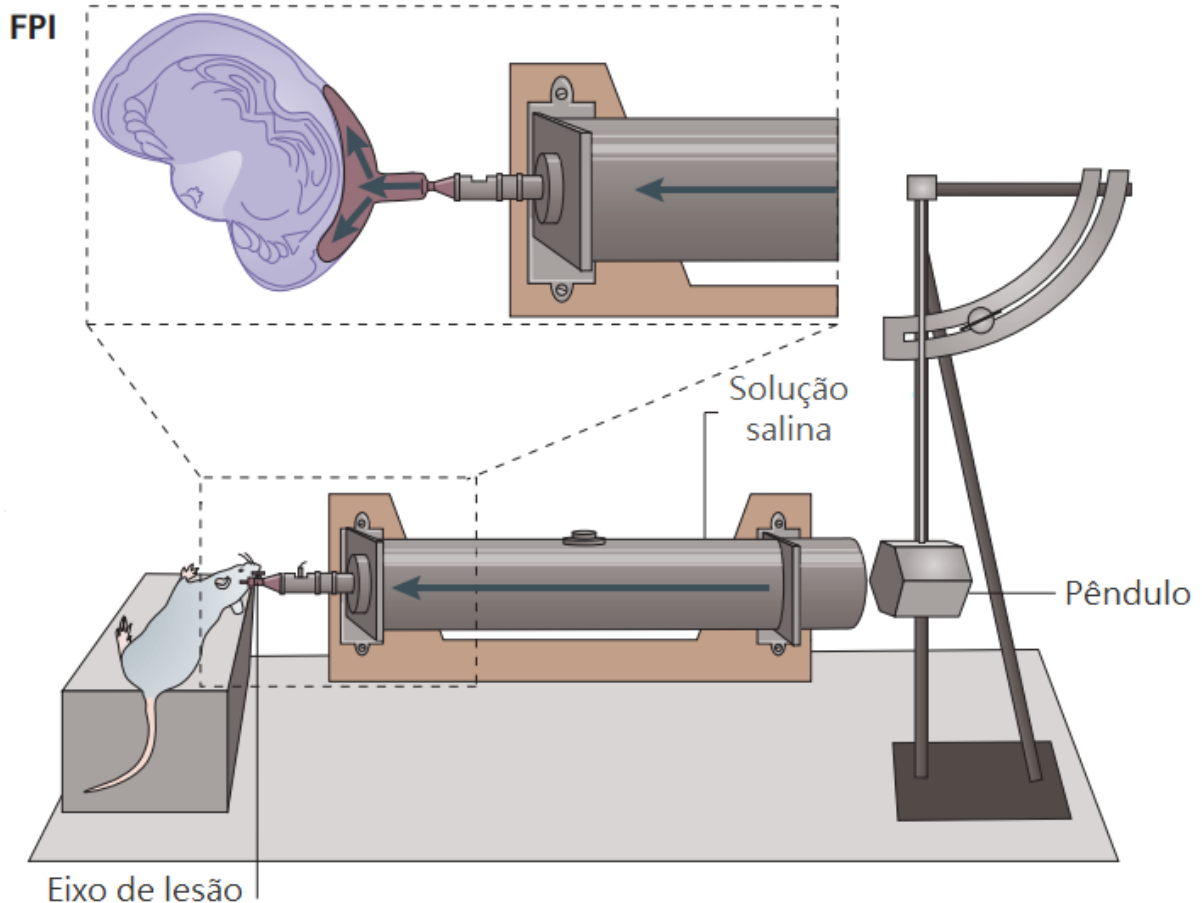
2.1.4 Modelos Experimentais do TCE

Para estudar os diferentes tipos de patologias subjacentes do TCE, considerando toda sua heterogeneidade encontrada na clínica (*i.e.*, idade, severidade do impacto, tipo, gênero, localização da lesão, entre outros), foram desenvolvidos ao longo dos anos diversos modelos de TCE de animais de grande e pequeno porte, como forma de mimetizar tal dano provocado por este tipo de lesão traumática. Neste sentido, o modelo de lesão por percussão de fluido (LPF) está entre os modelos mais comuns e bem caracterizados de TCE e por esta razão, tornou-se um dos modelos amplamente utilizados no âmbito da pesquisa atual. O modelo de LPF foi desenvolvido inicialmente para uso em ovelhas, cães, gatos, porcos e coelhos no início da década de 1940, sendo adaptado posteriormente para roedores no final da década de 1980. No entanto, embora os animais de grande porte sejam próximos em tamanho e fisiologia aos seres humanos, os roedores são os mais utilizados em pesquisas de TCE em virtude de seu baixo custo, tamanho e por permitir medidas padronizadas de resultados (HAYES *et al.*, 1987; MARMAROU; SHIMA, 1990; MILLEN; GLAUSER; FAIRMAN, 1985; THIBault *et al.*, 1992).

O impacto da força mecânica gerada pelo dispositivo pode ser aplicado sobre o encéfalo do animal centralmente em torno da linha média entre o bregma e o lambda, ou lateralmente sobre o osso parietal entre o bregma e o lambda. No entanto é necessária a realização de uma cirurgia (*i.e.*, craniectomia) prévia para retirada de fragmentos ósseos destinado ao local da lesão. A localização precisa da craniectomia

define os tipos de lesão causada nos modelos de LPF aplicado. Assim, quando a craniectomia é realizada sobre o centro da sutura sagital, ela é conhecida como LPF central, porém quando a craniectomia é realizada em 3,5 mm lateral à linha média é denominada LPF lateral, ou LPF parassagital para uma craniectomia realizada a menos de 3,5 mm lateral a linha média (FLOYD *et al.*, 2002; MCINTOSH *et al.*, 1989; ZIEBELL *et al.*, 2016). A lesão provocada no LPF é induzida por um pêndulo atingindo o pistão na extremidade de um reservatório preenchido com solução salina (0,9%), conforme ilustrado na Figura 2. O impulso da pressão do fluido atinge então a dura-máter intacta que foi exposta anteriormente pela craniectomia, ocasionando danos ao tecido cerebral (THOMPSON *et al.*, 2005).

Figura 2 - Modelo de traumatismo cranioencefálico de lesão por percussão de fluido.



Fonte: Adaptado de XIONG; MAHMOOD; CHOPP (2013).

A severidade da lesão pode ser medida em valores de atmosfera (atm). Para estudo em ratos, é determinado que a valores de atm menor de 1 está associado a uma lesão de grau leve, enquanto que um pulso de pressão medido entre 1,5-2,0 atm

é atribuído a um grau de lesão moderado ou ainda um pulso de pressão de 2,6-3,6 atm classifica o TCE como nível grave. Existem outras formas de avaliar o nível de gravidade da lesão que também podem ser usadas tais como medidas de técnicas neurológicas, fisiológicas, neurocomportamentais e histológicas. Diante da disponibilidade de recursos e a experiência da equipe de pesquisa é possível implementar o desenho do experimento com maior eficiência e probabilidade de sucesso (MCINTOSH *et al.*, 1989). Existem diferenças entre valores de atm encontrados na literatura atual, no entanto estão correlacionados aos diferentes dispositivos de LPF e os variados métodos de mensuração de pressão em atm utilizados, bem como observações da condição do animal após a lesão (PIERCE *et al.*, 1998).

Nesta perspectiva, o modelo de TCE causado por LPF é capaz de reproduzir os processos fisiológicos, neurológicos, morfológicos e até mesmo biomecânicos encontrados no TCE na clínica do tipo fechado. Por isso, as vantagens do LPF para modelar o TCE são baseadas em sua capacidade de produzir um deslocamento breve e deformação do tecido cerebral, resultando em lesões focais e difusas, hemorragia intracraniana, interrupção da barreira hematoencefálica (BHE), inchaço cerebral e danos a massa cinzenta. No modelo de LPF com ratos, foram demonstrados que este produz déficits que podem durar semanas a meses após o TCE, fornecendo possibilidades para avaliar a eficácia terapêutica (PIERCE *et al.*, 1998; XIONG; MAHMOOD; CHOPP, 2013).

2.1.5 Fisiopatologia do TCE

Os principais mecanismos envolvidos no TCE são induzidos a partir de forças biomecânicas ocasionado simultaneamente no momento do impacto, tal como fatores subjacentes decorrentes de danos sistêmicos, resultando na piora nas lesões neuronais sobre os pacientes. Estudos estimaram anteriormente que grande parte do dano neuronal não ocorre instantaneamente, entretanto é capaz de evoluir por dias ou mesmo anos após a lesão (NOLAN, 2005; PRINS *et al.*, 2013). Os desfechos neurocríticos finais decorrentes de qualquer lesão cerebral são determinadas conforme sua progressão no tempo. Estas são classificadas em duas fases com

características fisiológicas e patológicas distintas, denominadas como lesões cerebrais primárias e secundárias (MARSHALL, 2000).

As lesões cerebrais primárias são caracterizadas particularmente pelas forças mecânicas diretas que ocorrem no momento do impacto sobre o tecido cerebral, causando danos focais (*e.g.*, hematomas intracranianos epidurais e subdurais, fraturas no crânio, lacerações da substância cinzenta, contusões e feridas penetrantes) e difusos como inchaço cerebral e lesão axonal difusa (LAD). O dano primário ocasionado pelo TCE geralmente ocorre em um curto período de tempo (aproximadamente 100 milissegundos), no entanto pode ser suficiente para abranger a deterioração e deformação da caixa craniana ou mesmo compressão do tecido cerebral (HUFFMAN *et al.*, 2010). Em termos de tratamento, este tipo de dano é especificamente sensível a medidas de prevenção, todavia pode ser abordado terapêuticamente (NORTJE; MENON, 2004).

Em contrapartida, as lesões cerebrais secundárias (*e.g.*, lesões não mecânicas tardias) são responsáveis pelas respostas fisiológicas causadas inicialmente após as lesões primárias tais como disfunção mitocondrial, aumento da pressão intracraniana, excitotoxicidade, estresse oxidativo e inflamação, da qual pode manter-se ao longo de dias, meses e até anos após o TCE. Acredita-se que a maior parte da disfunção cerebral após TCE seja atribuída a mecanismos associados a este tipo de lesão (KAUR; SHARMA, 2018). A pesquisa básica associada aos danos em lesões secundárias tem evoluído significativamente, no entanto traduzir estes mecanismos encontrados para o benefício real do paciente ainda continua sendo um grande desafio.

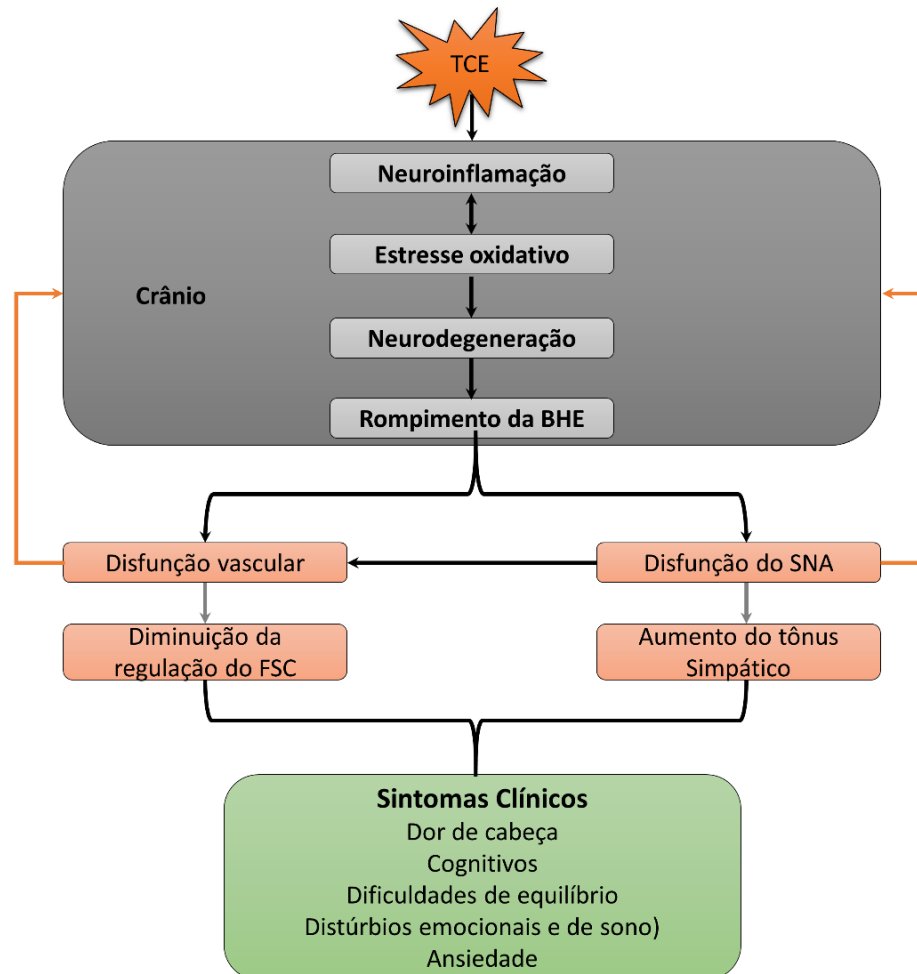
Embora alguns estudos tenham relatado em grande quantidade os danos primários e secundários anteriormente associados ao TCE, pouco é compreendido sobre a fisiopatologia e o impacto das complicações sistêmicas sobre este tipo de traumatismo. Estudos relataram anteriormente, que 89% dos pacientes que sofrem TCE mais severo podem expressar significativa disfunção de algum órgão sistêmico, mesmo na ausência de lesão extracraniana direta de qualquer órgão, o que pode resultar na maioria das vezes na piora do estado do paciente em longo prazo (ZYGUN *et al.*, 2005). Estes achados tem sido correlacionado ainda como fator de risco para morbidade e mortalidade em indivíduos que sofreram TCE com grau mais severo (ZYGUN, 2005). Dentre os sistemas afetados inclui-se o cardiovascular, respiratório,

imunológico, hematológico, endocrinológico entre outros (*i.e.*, hipermetabólico, ulceração péptica, ulceração do íleo e lesões iatrogênicas¹. No entanto, os órgãos afetados com maior incidência abrangem basicamente o sistema cardiovascular (52%) e o respiratório (81%), ocorrendo com 18% e 23% de taxas de incidência de falhas, respectivamente (WIJAYATILAKE; SHERREN; JIGAJINNI, 2015; ZYGUN *et al.*, 2005).

As anormalidades associadas ao sistema cardiovascular após TCE compreende principalmente a regulação autônoma cardíaca associadas as vias simpáticas e parassimpáticas do SNA. Este fenômeno é conhecido na literatura por desregulação do SNA ou disautonomia. É caracterizada por alterações diferentes nas atividades cardiovascular, na função do sono e em biomarcadores específicos de dano neural. O SNA desempenha uma função importante na produção e regulação de moléculas pró-inflamatórias (PURKAYASTHA; STOKES; BELL, 2019). No entanto, sua desregulação aumenta de imediato o tônus simpático, contribuindo para um quadro de neuroinflamação e de estresse oxidativo. Embora o encéfalo seja protegido inicialmente pela BHE, este pode ficar vulnerável a altas taxas metabólicas oxidativas, podendo por fim comprometer o funcionamento da modulação do SNA e da função vascular, levando a desregulação do fluxo sanguíneo cerebral (FSC), conforme demonstrado na Figura 3 (CERNAK *et al.*, 2010; MILLEN; GLAUSER; FAIRMAN, 1985; PURKAYASTHA; STOKES; BELL, 2019). Os principais sintomas clínicos vinculados a este fenômeno pós-traumático são ansiedade, dificuldades de equilíbrio, cefaleia, tontura, comprometimento cognitivo e distúrbios emocionais e de sono (JORDAN, 2013). Todavia, embora as mudanças nas atividades do SNA possam promover uma cascata de eventos devastadores para a manutenção adequada da homeostase corporal, poucos estudos foram explorados em humanos e bem menos ainda em modelos experimentais de TCE com animais. Portanto, é fundamental entender melhor a regulação da modulação do SNA na fisiopatologia do TCE, a fim de buscar melhorias de prevenções no tratamento ocasionado pelo TCE (ROYES; GOMEZ-PINILLA, 2019).

¹ Os danos iatrogênicos após lesão encefálica podem ocorrer por meio de intervenções de órgãos direcionados à otimização da pressão de perfusão cerebral, tais como fluidos, ventilação e agentes inpressores.

Figura 3 - Diagrama de representação do TCE, resultando em desregulação do SNA e manifestações de sintomas clínicos.



Fonte: Modificado de PURKAYASTHA; STOKES; BELL (2019).

2.1.5.1 SNA e TCE

O TCE é uma lesão cerebral que acarreta uma variedade de déficits cardiovasculares entre outras funções dos órgãos do corpo (e.g., fígado, pâncreas, baço e falhas subsequentes nas funções metabólicas e imunológicas), incluindo o SNA. Estudos reportaram que 90% dos pacientes que sofreram por TCE, demonstraram sinais de disfunção da atividade autonômica durante a primeira semana após a lesão, da qual um terço destes pacientes desenvolveram disfunção autônoma. Assim, a perturbação do SNA tornou-se um fator de grande relevância na sintomatologia do TCE, associando-se a todos os níveis de gravidade de lesão (ROYES; GOMEZ-PINILLA, 2019). O TCE desencadeia seus danos sobre a fisiologia cardiovascular, principalmente prejudicando a regulação central correlacionada ao

eixo hipotálamo-hipófise. Estes dois processos associados ao sistema imunológico são definidos como o centro da interação entre o cérebro e o corpo e por isso desempenham juntos um papel central na regulação geral da homeostase corpórea. Dito isso, estudos indicam que mudanças no sistema hipotálamo-hipófise associados ao TCE, pode trazer prejuízos devastadores para a fisiologia cardíaca do corpo (ANTHONY; PITOSI, 2013; SHI *et al.*, 2016).

A regulação do sistema autônomo central engloba uma rede complexa no sistema nervoso central (SNC) correlacionando-se a áreas do córtex cerebral (*i.e.*, regiões insular, pré-frontal e medial), amígdala, estria terminal, hipotálamo e centros do tronco cerebral (*i.e.*, substância cinzenta periaquedutal, núcleo parabraquial do trato solitário e a zona reticular intermediária da medula). Deste modo, diversos estudos tem demonstrado que a amígdala seja a principal fonte de modulação eferente para as respostas do sistema cardiovascular, autônomo e endócrina entre o córtex pré-frontal e o coração (MCCORRY, 2007). No entanto, outro estudo também sugere que o córtex pré-frontal possa controlar o tônus vagal cardíaco e o miogênico (BISHOP *et al.*, 2017). Estes processos foram confirmados por alguns estudos, que apontaram que quando a modulação do sistema autônomo é submetido a qualquer grau de lesão de TCE, este gera efeitos adversos de estresse generalizado, que pode inibir o núcleo central da amígdala, induzindo por fim um aumento das atividades do tônus simpático e da frequência cardíaca (FC), com concomitante declínio da atividade global da VFC mediada pela função do tônus vagal (CONDER; CONDER, 2014; MEYFROIDT; BAGULEY; MENON, 2017).

Neste contexto, a maioria dos pacientes que sofrem de TCE vinculado a função autônoma, reportam ativação instantânea do sistema nervoso simpático, com episódios subsequentes de aumento de frequência cardíaca, pressão arterial, sudorese, hipertermia e postura motora. A ocorrência da ativação imediata do tônus simpático após o TCE é extremamente importante para a sobrevivência do indivíduo acometido, pois a hipotensão precoce (*i.e.*, pressão arterial sistólica menor que 90 mmHg) está associada a um alto fator de risco para mortalidade. Do mesmo modo, a hipotensão tardia está correlacionada a um fator de risco para mortalidade 11 vezes maior após TCE de severidade grave (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2017). Assim, implicações na regulação da função autônoma com subsequentes episódios de aumento das atividades do tônus simpático ou com atividade vagal diminuída podem

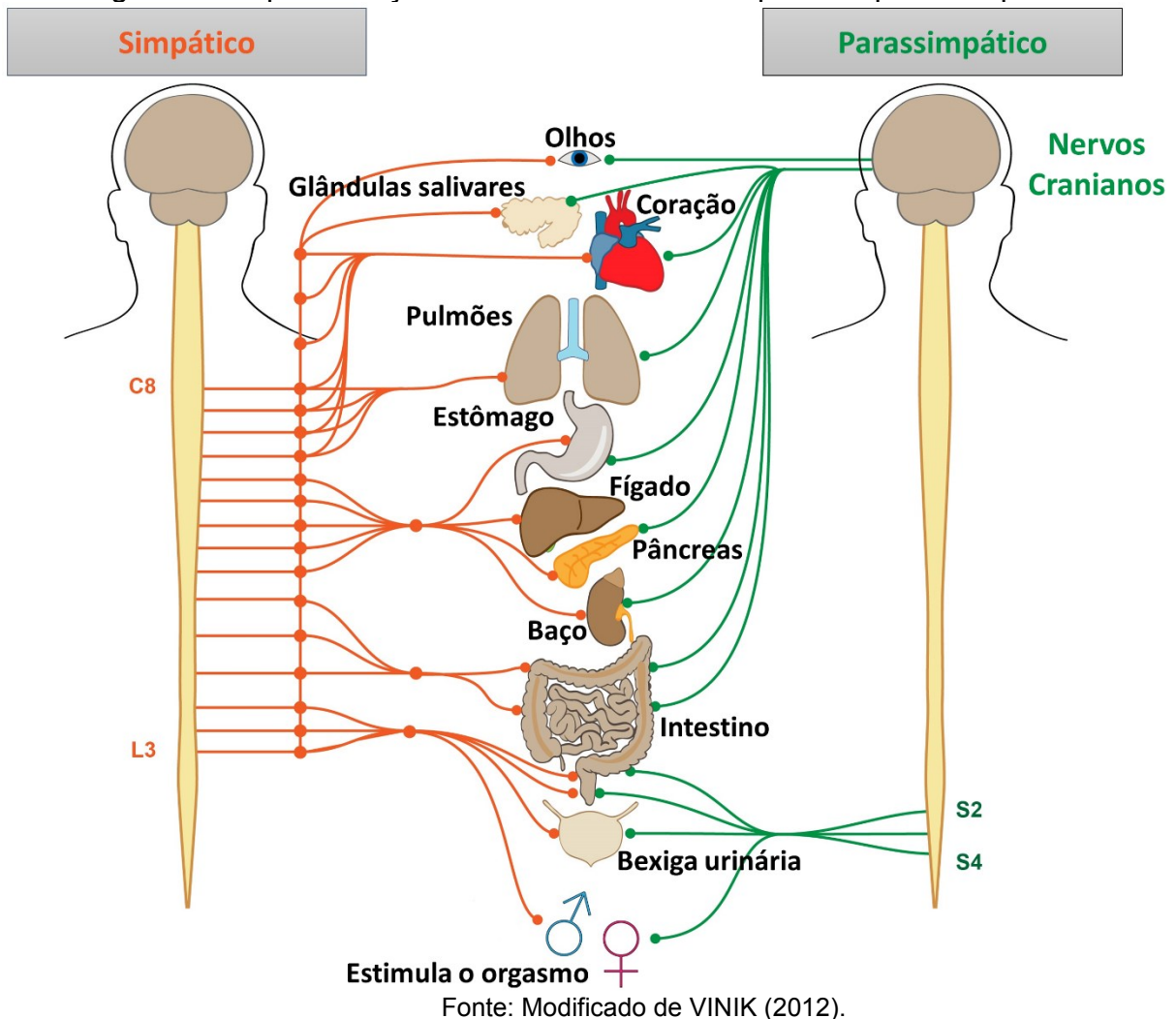
por vezes desencadear taquicardias ventriculares ou ainda morte súbita cardíaca. Além disso, algumas doenças foram correlacionadas com a disfunção do SNA após lesão cerebral traumática de todos os níveis, tais como depressão, transtorno psiquiátrico, esquizofrenia e transtornos do pânico, sendo sugerida como um forte marcador para transtornos de ansiedade generalizada, transtorno de estresse pós-traumático e predisposição para reação com a processos estressores externos e internos (ALVARES *et al.*, 2016; HENDÉN *et al.*, 2014).

Em parâmetros gerais, a perturbação da modulação autônoma após TCE é um mecanismo fisiopatológico significativo que por consequências subjacentes pode em sua maioria levar a uma piora da qualidade de vida dos indivíduos, integrando altas taxas para o aumento de morbidade e mortalidade em TCE de moderada e grave severidade. Ademais, os indivíduos atingidos por lesões mais severas (*i.e.*, moderado e grave), tendem a apresentar uma duração longa de amnésia pós-traumática, internações mais prolongadas no hospital, o que conseqüentemente gera maiores custos gerais de saúde após desregulação da função autônoma (BAGULEY *et al.*, 2007).

2.2 SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO

O SNA compreende uma porção do SNC que regula as diversas funções fisiológicas do corpo (*e.g.*, frequência cardíaca, pressão arterial, função glandular, atividade visceral, impulsos nervos, termorregulação, entre outros) a fim de manter a homeostase (Figura 4) (MCCORRY, 2007). Este tipo de ação ocorre imediatamente e automaticamente, sempre que ocorre uma mudança que exija um ajuste regulatório. Este é gerada sem qualquer mecanismo de consciência voluntário. A atividade cardíaca é regulada através de uma combinação de receptores, nervos aferentes (sensoriais) e eferentes (motores). Neste sentido, o SNA inerva todos os órgãos especificamente efetores (músculo liso, músculo cardíaco e as glândulas), exceto os músculos esqueléticos (ROBERTSON; LOW; PLINSKY, 2012). Os neurônios motores do SNA são distribuídos em padrão distinto, o que levou a sua separação para fins de estudo em divisões do sistema nervoso simpático (SNS) e sistema nervoso parassimpático (SNP). Logo, muitos órgãos são controlados principalmente por estas duas ramificações (HEMMINGS; EGAN, 2018).

Figura 4 - Representação da divisão do SNA simpático e parassimpático.



Geralmente, essas duas divisões regulam as funções fisiológicas do corpo de forma antagônica sobre o mesmo órgão. Por exemplo, a divisão do SNS aumenta a frequência cardíaca, enquanto que divisão do SNP fica responsável por diminuir a mesma. Portanto, o SNS está correlacionado à resposta a situações de estresse fisiológico, sendo atribuída a este sistema a regulação de respostas do tipo fuga ou luta. Por outro lado, o SNP está associado ao controle de funções relativas ao funcionamento regulatório do organismo no longo prazo (e.g., digestão, crescimento e armazenamento energético) (HEMMINGS; EGAN, 2018). Embora algumas exceções sejam descritas na literatura, acredita-se que a estimulação ocorra através do SNS, enquanto que a inibição ocorra através do SNP. Em geral, as duas divisões trabalham juntas para garantir que o organismo responda adequadamente as

diferentes situações fisiológicas que possa ocorrer (HEMMINGS; EGAN, 2018; ROBERTSON; LOW; PLINSKY, 2012).

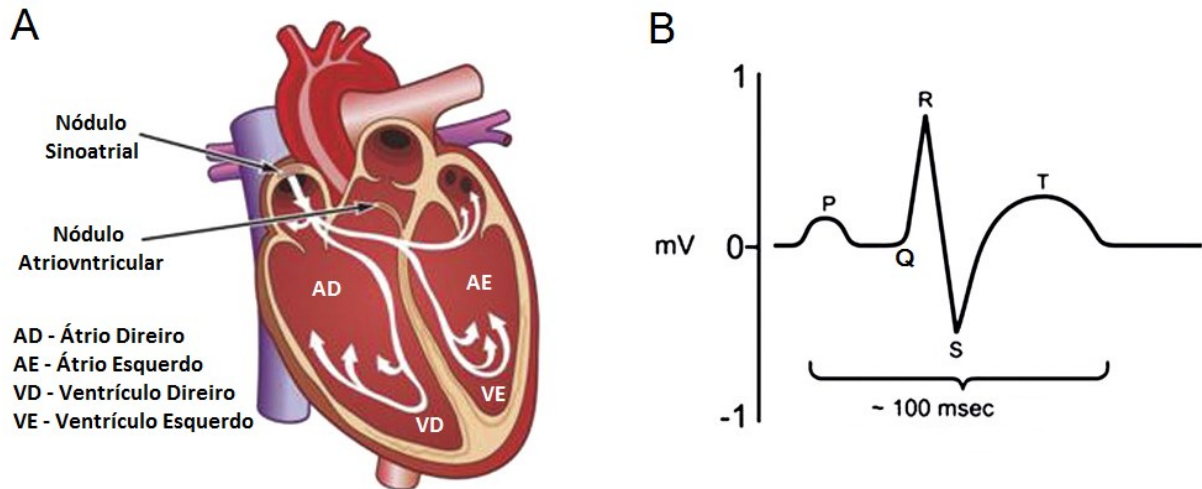
Os estímulos do SNA saem do SNC e percorrem para os órgãos efetores por meio de dois neurônios eferentes. O primeiro neurônio (neurônio pré-ganglionar) sincroniza com o segundo (neurônio pós-ganglionar) em um gânglio autônomo. Anatomicamente, o SNA possui neurônios de origens distintas em suas duas ramificações. Os neurônios do SNS têm origem na região torácica e lombar da medula espinhal (T1-L2/3), enquanto que os neurônios do SNP são oriundos das regiões cranianas ou sacral da medula espinhal (JAMALI; WAQAR; GERSON, 2016). Existe também dois neurotransmissores principais, ou mensageiros químicos importantes, responsáveis pela comunicação dentro do SNA. A acetilcolina, que é frequentemente utilizada no SNP para ter um efeito inibidor, e a norepinefrina que geralmente trabalha dentro do SNS para ter um efeito estimulador no corpo (HEMMINGS; EGAN, 2018).

2.2.1 Variabilidade da Frequência Cardíaca

Assim como em humanos, os batimentos cardíacos em ratos são iniciados dentro de um agrupamento de células cardíacas no nódulo sinoatrial. Este é localizado na parede miocárdica do átrio direito e funciona como um marcapasso primário do coração (Figura 5A). Essas células são caracterizadas por mecanismo de automaticidade, um fenômeno que exhibe despolarização e repolarização cíclica a uma alta taxa consistente. Assim, a partir de informações das vias do SNA, são descarregados potenciais de ação no nódulo sinoatrial (VAN RAVENSWAALJ-ARTS *et al.*, 1993).

Uma vez iniciada, a onda P aparece no ECG e o potencial de ação é propagado através das vias de condução intermodal ao nódulo atrioventricular, promovendo uma breve pausa antes da transmissão para o feixe atrioventricular. Posteriormente, o complexo QRS aparece no ECG à medida que potencial de ação se espalha pela via de condução da bifurcação dos ramos do feixe de His esquerdo e direito para despolarizar o miocárdio ventricular. E por fim a onda T, que aparece na repolarização dos ventrículos (Figura 5B). Esta última onda pode em alguns casos ser acompanhada de uma onda U, correspondente a fração do potencial de repolarização (GUDMUNDSSON; RUNARSSON; SIGURDSSON, 2012).

Figura 5 - Ilustração do sistema cardiovascular de um rato.



(A) representação do coração. (B) Traçado eletrocardiográfico.
 Fonte: Adaptado de FARRAJ; HAZARI; CASCIO (2011).

A taxa de despolarização do potencial em estado de repouso, pode ser influenciada por alguns processos (e.g., ativação das vias do SNA, produtos farmacêuticos, genética ou algum tipo de patologia), que por consequência pode aumentar ou diminuir a frequência cardíaca. Por esta razão, os ritmos cardíacos afetam o controle das funções fisiológicas do corpo, desempenhando um papel fundamental na manutenção da saúde (VAN RAVENSWAAIJ-ARTS *et al.*, 1993; VASSALLE; ZHANG, 2001). Desta forma, os mecanismos fisiológicos dos ramos do SNA (*i.e.*, simpático e parassimpático) no nódulo sinoatrial funciona basicamente como uma relação bilateral, ou seja, a manifestação dessa reciprocidade são flutuações do período cardíaco em torno de uma frequência média postulada como variabilidade da frequência cardíaca (VFC). Atualmente, esta tem sido comumente utilizada em diversos contextos clínicos como uma ferramenta de triagem para quantificação da modulação do SNA, bem como em modelos experimentais de pesquisa (ABAJI *et al.*, 2016).

A VFC é uma técnica não invasiva disponível, que permite examinar de maneira fácil o estresse psicofisiológico (agudo ou crônico), a partir de registros do ECG digital. Portanto, quando o animal é exposto a um estado de estresse, é gerado um desequilíbrio sobre os ramos do SNA que como resultado proporciona o aumento/diminuição do SNS, bem como do SNP (SCHUBERT *et al.*, 2009). Embora, essas oscilações da VFC sejam frequentemente atribuídas apenas e exclusivamente a alterações na sinalização do SNA, é importante ressaltar que mudanças na atividade

do receptor do tecido cardíaco também pode impactar na dinâmica da VFC. Mudanças na VFC também podem estar associadas a lesão cardíaca, hipertrofia ou mesmo fibrose. No entanto, os fatores responsáveis por estas alterações certamente devem envolver tanto o miocárdio quanto o SNA (PUMPRLA *et al.*, 2002).

Embora uma explicação completa da avaliação da VFC esteja além do escopo dessa dissertação, estamos interessados nas medidas tradicionalmente citadas na literatura de pesquisa que são passíveis de medição em modelos experimentais com ratos, associadas aos correlatos clínicos cardíacos de TCE. A VFC tem se tornado um importante marcador não invasivo para avaliação da modulação autônoma de diversas doenças em pacientes, incluindo aqueles acometidos por TCE de todos os níveis de gravidade. No entanto, em modelos experimentais de TCE com roedores é quase que desconhecido sua utilização, devido à dificuldade em se mensurar o ECG especificamente neste tipo de animal, entre outras interferências. Ainda que em menor quantidade em comparação com os humanos devido à dificuldade de se medir o ECG, outros modelos experimentais de VFC com ratos também têm sido usados na pesquisa (CARNEVALI; SGOIFO, 2014; ZILA *et al.*, 2015). Pesquisadores analisam a relação da VFC com SNA na compreensão da patologia cardiovascular decorrente do TCE, através de medidas descritivas no domínio do tempo por meio de cálculos estatísticos das ondas R sucessivas (conhecido como intervalo RR ou intervalo NN) ou ainda medidas no domínio da frequência que também auxiliam na compreensão da função autonômica (RAPENNE *et al.*, 2001). Estudos de TCE realizados anteriormente, tanto com pacientes na clínica quanto em modelos experimentais com ratos, demonstram que a frequência cardíaca cíclica diminui após a lesão. Neste caminho, acredita-se que VFC reflete os mecanismos da atividade do tronco cerebral em regiões que modulam o controle cardiovascular. Neste sentido, a avaliação da VFC possui uma extrema relevância quando aplicada como uma ferramenta de diagnóstico clínico, principalmente quando complementada com outros métodos de diagnóstico (SU *et al.*, 2005; UMEMOTO; CHITRAVANSI, 2017).

2.2.1.1 Análise no Domínio do Tempo

A análise da VFC no domínio do tempo é uma abordagem metodológica baseada em cálculos estatísticos descritivos, que são extraídos de intervalos de

tempo do período cardíaco (intervalo RR ou intervalo NN) ou de diferenças no intervalo do período cardíaco. Esta abordagem permite a caracterização da variabilidade em curto prazo, representando mudanças rápidas na frequência cardíaca (influenciadas pela arritmia sinusal respiratória) ou em longo prazo, representando flutuações mais lentas da frequência cardíaca (influenciadas por alterações termoregulatórias e barorreflexas) (AUBERT *et al.*, 1999; LEES *et al.*, 2018; TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY; THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996). O Quadro 2, apresenta as principais métricas lineares e não lineares utilizadas na avaliação do TCE clínico e que também são aplicadas aos modelos experimentais com ratos, bem como sua influência na modulação do SNA.

Quadro 2 – Principais parâmetros lineares e não lineares da VFC descritas no domínio do tempo.

Parâmetros	Definição	Significância clínica
Métricas Lineares		
Frequência cardíaca (bpm)	Média de frequência cardíaca	VFC global
Média NN (ms)	Média de todos os intervalos NN	VFC global
SDNN (ms)	Desvio padrão de todos os intervalos NN	VFC global
RMSSD (ms)	Valor quadrático médio das diferenças entre os intervalos NN adjacentes	Parassimpático
Métricas Não-lineares		
SD1	Desvio padrão da variabilidade instantânea (a curto prazo) do intervalo NN	Parassimpático
SD2	Desvio padrão da variabilidade dos intervalos NN a longo prazo	Balanço vagal global
SD1/SD2	Razão entre desvio da variabilidade dos intervalos NN a curto e longo prazo	Simpático e balanço vagal global

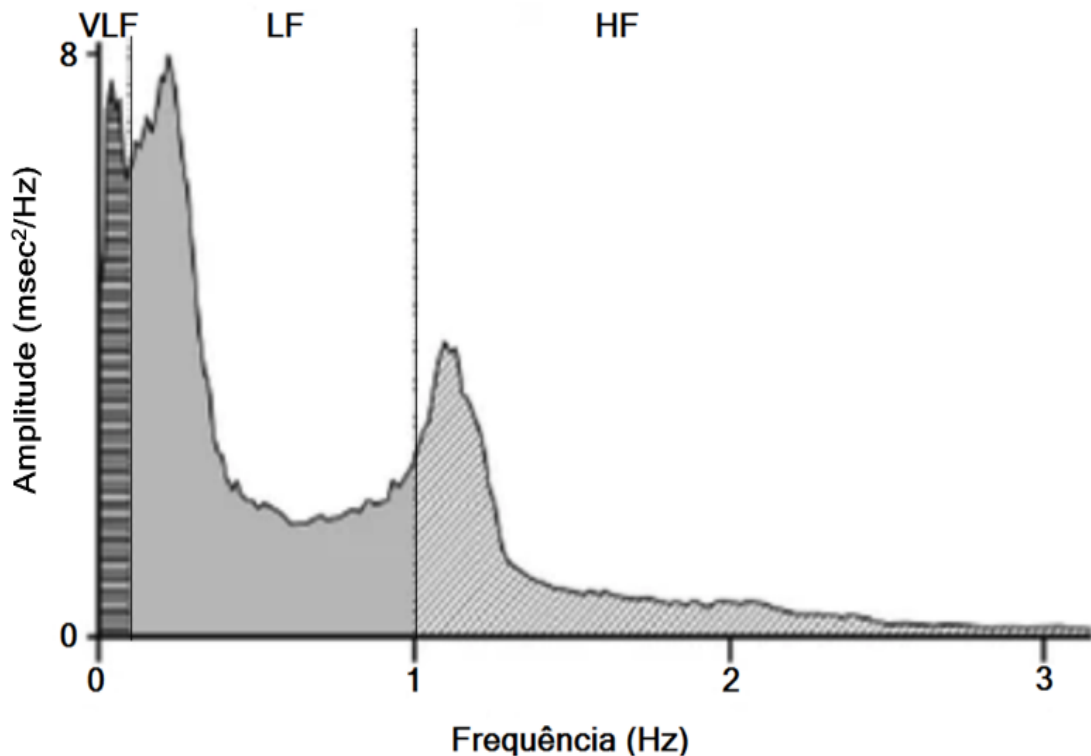
Fonte: AUBERT *et al.* (1999); LEES *et al.* (2018); TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY; THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY (1996); TULPPO *et al.* (1996).

2.2.1.2 Análise no Domínio da Frequência

A análise da VFC no domínio da frequência (*i.e.*, densidade espectral de potência), fornece informações lineares básicas de como a energia (ou seja, sua variação) se distribui como uma função da frequência. Essa potência espectral é matematicamente decomposta através de um algoritmo implementado utilizando a

Transformada Rápida de Fourier (FFT, do inglês “Fast Fourier Transform”), que produz uma curva com vários picos agrupados em torno de bandas de frequência específicas, conforme ilustrado na Figura 6. O desenho espectral das oscilações de frequência geradas fornecem informações sobre os ritmos de frequência em muito baixa frequência (VLF, do inglês “Very Low Frequency), baixa frequência (LF, do inglês “Low Frequency) e alta frequência (HF, do inglês “High Frequency). Diferentemente dos humanos, os ratos apresentam bandas de frequências maiores conforme mostrado no Quadro 3. As componentes espectrais LF e HF são frequentemente expressas como unidades normalizadas (nu, do inglês “normalized unit”), a qual representa o valor relativo de cada componente subjacente ao espectro total. Embora a componente VLF seja conhecida, pouco sabe-se sobre sua atribuição na VFC. Assim, a literatura reporta que em gravações do ECG em curto prazo (*i.e.*, 5 minutos), esta medida deve ser evitada para a interpretação do espectro total da VFC (AUBERT *et al.*, 1999; LEES *et al.*, 2018; TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY; THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996).

Figura 6 - Espectro de potência representativo da VFC em um rato, utilizando FFT. As bandas VLF, LF e HF são representadas.



Fonte: Adaptado de ROWAN et al. (2007).

Quadro 3 – Principais parâmetros lineares da VFC descritas no domínio da frequência.

Parâmetros	Definição	Significância clínica	Banda de frequência
Métricas Lineares			
VLF	Componente de muito baixa frequência em unidade normalizada	Ritmo circadiano do coração	0 - 0,1 Hz
LFnu	Componente de baixa frequência em unidade normalizada	Simpático	0,1 - 1 Hz
HFnu	Componente de alta frequência em unidade normalizada	Parassimpático	1,0 - 3,5 Hz
LF/HF	Razão absoluta entre componente de baixa e alta frequência	Simpático e balanço vagal global	-

Fonte: AUBERT *et al.* (1999); ROWAN *et al.* (2007)

2.2.2 Eletrocardiograma em Ratos

Os sistemas de registro do ECG é uma ferramenta amplamente utilizada para a compreensão da fisiologia cardiovascular, tanto em aplicações clínicas como em animais experimentais de pesquisa. Nos últimos anos, diversas aplicações experimentais cardiovasculares exploradas especificamente em sistemas de ECG de ratos, tem contribuído muito para as indústrias farmacêuticas, principalmente em testes de validação associados a segurança de medicamentos atribuídos a fisiologia cardíaca. No entanto, para protocolos que avaliam a VFC em ratos, os dados adquiridos dos sistemas de registro do ECG existentes ainda são muito questionáveis, devido à sua maneira por vezes invasiva de mensuração sobre a fisiologia cardiovascular do animal (ACCARDI *et al.*, 2016; MONGUE-DIN *et al.*, 2007). Embora na última década, tenham sido desenvolvidos diversas abordagens alternativas diversificadas na tentativa de minimizar a sua influência sobre a VFC, os métodos empregados atualmente para registro de ECG em ratos ainda requerem o uso de administração de anestesia, procedimentos cirúrgicos, bem como contenção dos animais, o que em sua maioria é alvo de questionamento (FENSKE *et al.*, 2016; MONGUE-DIN *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2017).

Idealmente, os dados dos sinais associados aos sistemas de medida do ECG são contínuos, estáveis, livres de qualquer tipo de artefato e obtido por períodos idênticos por qualquer sistema. Contudo, na prática é muito difícil coletar dados desprovidos de poucos ruídos (*e.g.*, batimentos ectópicos, eventos de arritmias e

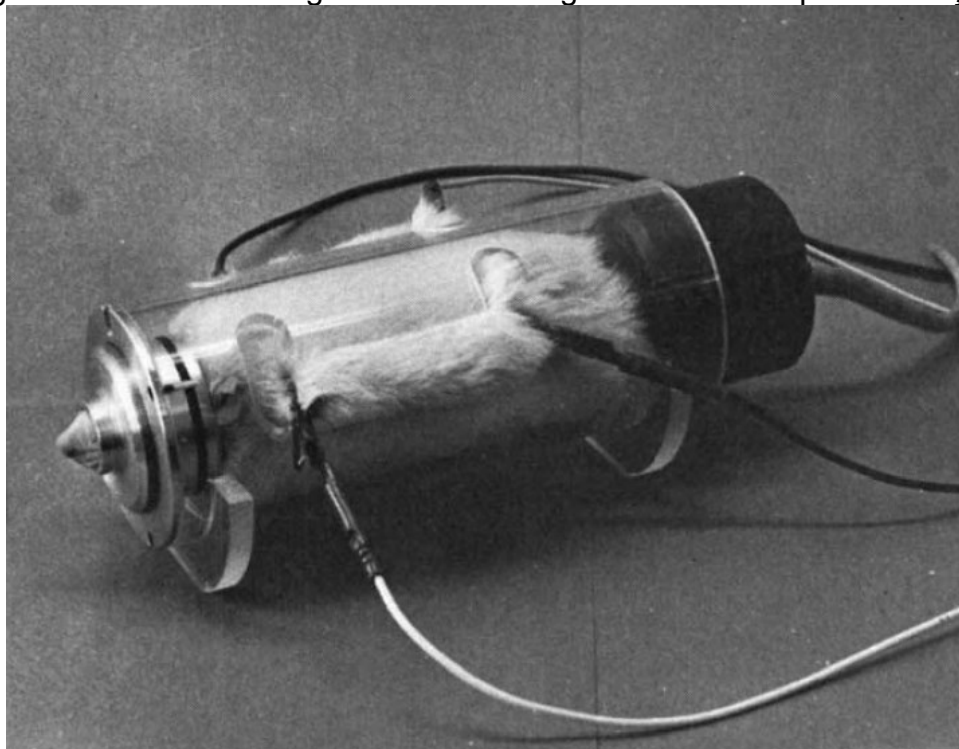
artefatos de movimento), quando efetuado a muitos grupos de animais em conjunto, além dos fatores citados anteriormente. Geralmente, os sinais brutos adquiridos pelos sistemas de registros, são inspecionados visualmente da qual é selecionada a melhor parte da amostra dos dados, descartando então as partes mais contaminada com ruídos (MONGUE-DIN *et al.*, 2007). Abordaremos a seguir, algumas das técnicas mais amplamente aplicáveis nos modelos experimentais para o registro do ECG em ratos.

2.2.2.1 Tipos de Sistemas de Registro do ECG em Ratos

2.2.2.1.1 Contenção

O sistema de registro do ECG em ratos por contenção é realizado normalmente através de tubos projetados, onde os animais ficam imobilizados em uma posição constante (Figura 7), da qual permite que o registro eletrocardiográfico seja realizado através de fios conectados a extremidade do animal ou por eletrodos na superfície na posição das patas dos animais, podendo ser aplicado em modelos de pequenos animais (hamster, camundongos e ratos).

Figura 7 - Sistema de registro eletrocardiográfico em ratos por contenção.



Fonte: OSBORNE (1973).

Neste tipo de sistema, o registro é feito sobre o animal em estado consciente, sem a necessidade de administração de anestésico ou procedimento cirúrgico (OSBORNE, 1973). Além disso, também possui um baixo custo de implementação e versatilidade de aplicação em diferentes tipos de roedores, permitindo a avaliação de vários animais em um curto espaço de tempo. A limitação questionável pertinente a este método, fica por conta do estresse fisiológico ocasionado pela imobilização do animal, bem como nas possíveis lesões causadas pelo tubo projetado, quando aplicado por exemplo em ratos neonatos ou em ratos com estado grave de doença. Estes processos por sua vez, pode implicar na influência sobre a função cardiovascular, bem como nos parâmetros associados ao SNA (MONGUE-DIN *et al.*, 2007).

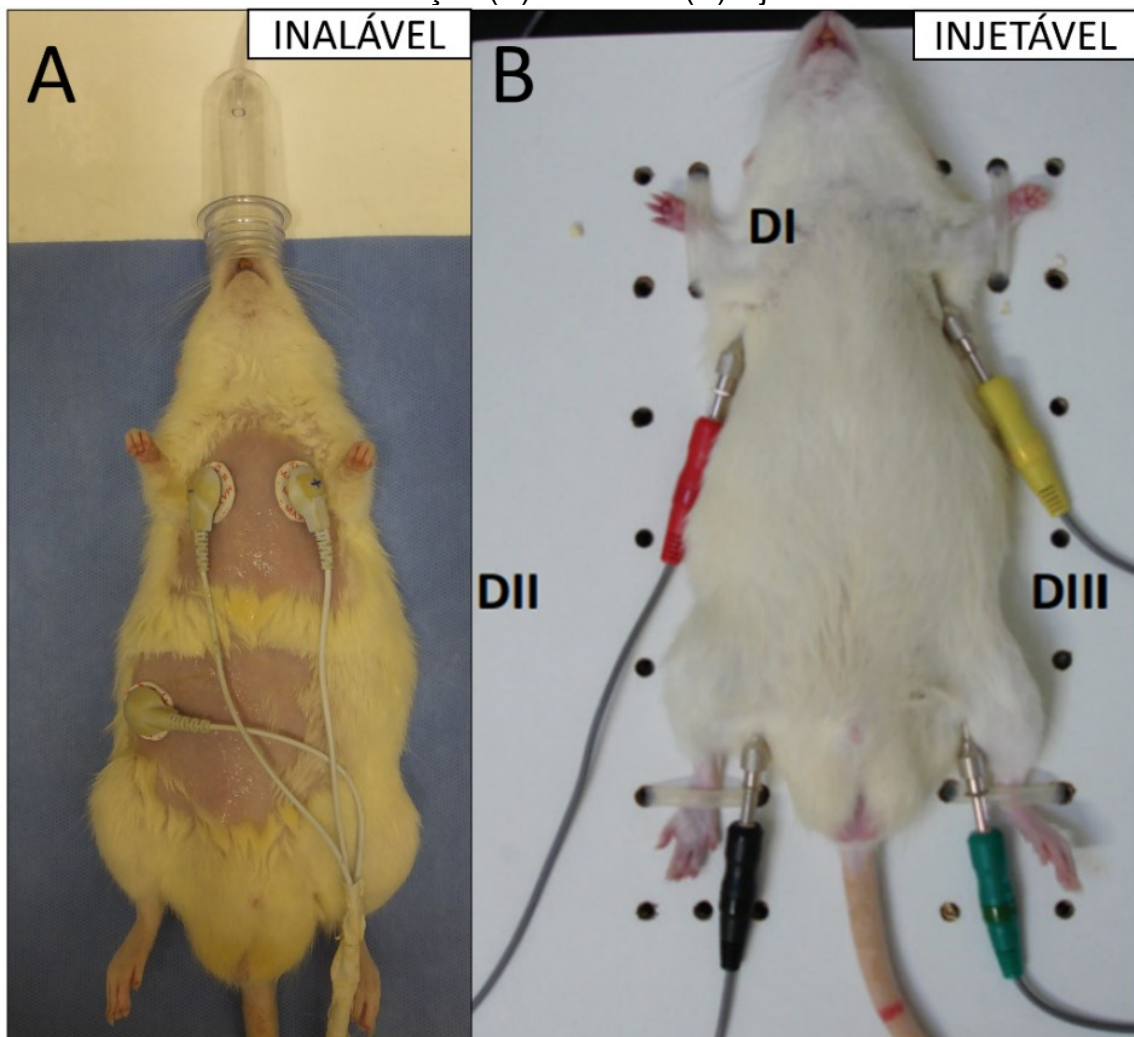
2.2.2.1.2 Anestesia

O registro do ECG através da administração de diferentes tipos de anestésicos tem sido usado a muitos anos. A anestesia é frequentemente usada, pois promove a contenção constante dos animais. Por se tratar de um método de fácil aplicação, baixo custo e pouquíssimo recurso para sua implementação, este é o mais amplamente utilizado em vários dos modelos experimentais. Este método consiste na simples administração injetável ou inalável de um tipo de anestésico sobre o animal, onde posteriormente os eletrodos do ECG são conectados nas derivações correspondentes, após o animal entrar em estado de anestesia, como visto na Figura 8 (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013). Embora esteja no momento em processo de substituição por novas abordagens metodológicas devido as suas diferentes influências sobre o sistema cardiovascular, este método ainda é muito usado no mundo. Os anestésicos injetáveis (Figura 8B) mais utilizados neste tipo de aplicação são o pentobarbital sódico, seguido de cetamina. Embora o pentobarbital tenha solubilidade lipídica, resultando na ação rápida sobre o cérebro, assim como o cetamina proporciona uma grande margem de segurança e compatibilidade com outros medicamentos, vários estudos demonstram efeitos adversos sobre o sistema cardiovascular, especialmente sobre os parâmetros da VFC quando utilizados (HILDEBRANDT; SU; WEBER, 2008; MURAKAMI *et al.*, 2014).

Já o anestésico inalatório (Figura 8A) mais utilizado nesta aplicação é o isoflurano. A anestesia inalatória envolve a administração da droga pelo sistema

respiratório, a qual permite seu uso seguro e confiável em relação aos anestésicos injetáveis. Embora este tipo de administração de medicamento requiera equipamento extra, seu uso está aumentando consideravelmente devido permitir o melhor controle sobre a duração e a profundidade da anestesia em comparação com os injetáveis (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013; MURAKAMI *et al.*, 2014). Além disso, estudos indicam que o isoflurano seja o anestésico mais adequado para o uso em modelos experimentais fisiológicos, em virtude de a função cardiovascular ser melhor mantida em relação aos anestésicos injetáveis. Em geral, a avaliação cardiovascular em modelos experimentais com ratos anestesiados é rotineiramente realizada, mesmo que se tenha o conhecimento sobre sua intervenção na atividade cardíaca (HILDEBRANDT; SU; WEBER, 2008; MURAKAMI *et al.*, 2014).

Figura 8 – Representação de ratos Wistars em estado anestesiado sobre administração (A) inalável e (B) injetável.

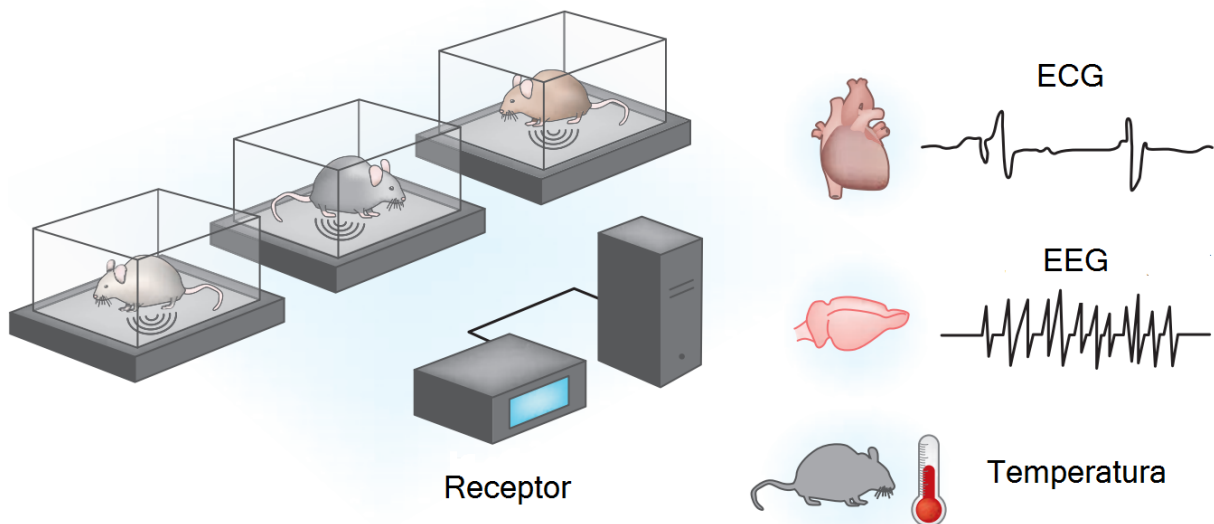


Fonte: (A) Fonte do próprio Autor (2020). (B) CHRISTOFOLETTI *et al.* (2013).

2.2.2.1.3 Telemetria

A telemetria é um método empregado para o monitoramento de parâmetros fisiológicos (ECG, EEG, frequência cardíaca, temperatura corporal, entre outros) em animais de laboratório (roedores, porcos, cães e macacos) no estado acordado, sem o uso de qualquer agente anestésico (Figura 9). Estudos reportam que este seja o protocolo mais eficiente já desenvolvido para medições fisiológicas *in vivo*. A telemetria é uma técnica na qual um transmissor é implantado nos animais, permitindo que os dados sejam registrados automaticamente e sem fio; ou seja, os dados são captados pelo transmissor implantado e são transmitidos para um receptor localizado fora do ambiente de experimentação dos animais. Além disso, a telemetria permite que o registro seja realizado por longos períodos, concebendo parâmetros muitos similares a fisiologia cardiovascular natural dos animais (ACCARDI *et al.*, 2016; NIEMEYER, 2016).

Figura 9 - Sistema de registro do ECG em ratos pela abordagem da telemetria.



Fonte: Adaptado de NIEMEYER (2016).

O objetivo principal do desenvolvimento deste método foi promover uma gama de dados fisiológicos requeridos sobre o animal, em estado acordado e sem perturbação, possibilitando a coleta de dados sem a necessidade de interação humana direta. Neste método, uma vez que o eletrodo transmissor é implantado nos animais e posteriormente estes recuperados do procedimento, os dados podem ser registrados constantemente, enquanto os animais se movimentam livremente no

ambiente (NIEMEYER, 2016). Embora a telemetria seja muito promissora para a medição dos parâmetros fisiológicos no futuro, apresentando dados mais confiáveis e otimizados em comparação com outras abordagens alternativas, este ainda possui numerosas limitações que precisam ser superadas, tais como um alto custo de implementação, tamanho físico limitado (requer um peso corporal mínimo do animal para implantação do eletrodo), bem como energia externa para sua operação. Além disso, este método não é aplicável a modelos experimentais fisiológicos cardiovasculares com animais em estado muito doente, em virtude da possível não sobrevivência dos animais ao procedimento cirúrgico (implante do eletrodo transmissor) (SOBOT, 2013; SZUTS *et al.*, 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

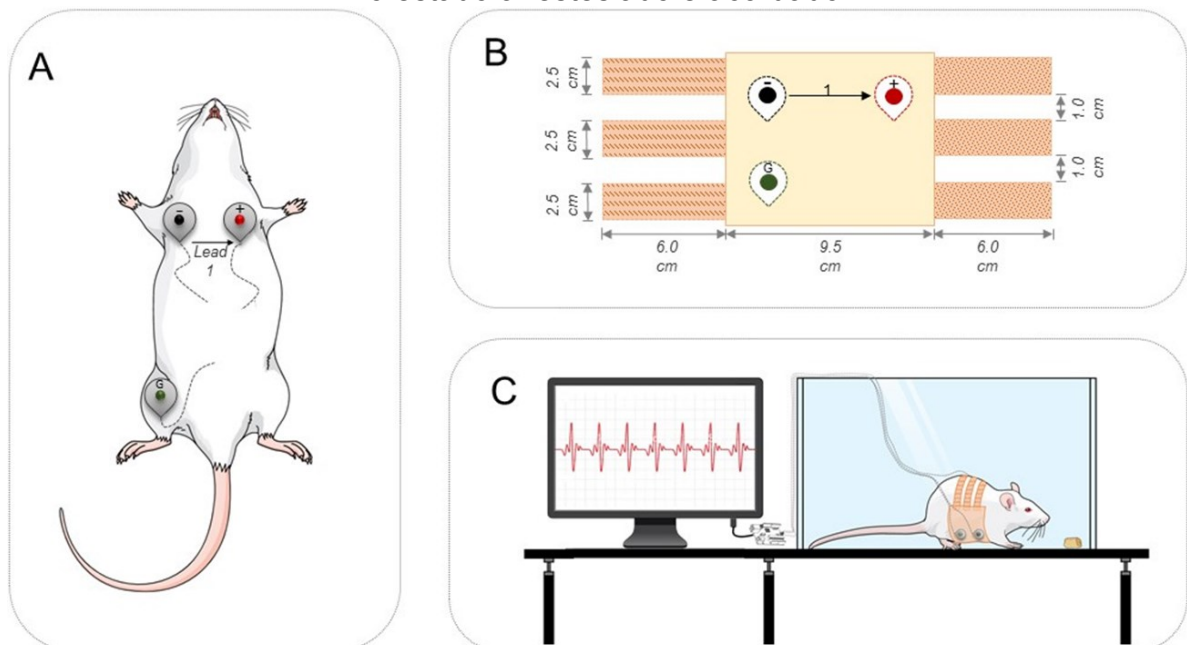
Um Total de 10 ratos Wistar, machos adultos (pesando entre 420-500g e com aproximadamente 180 dias de idade) cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob o projeto número 2712080317, foram utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos sob condições controladas de laboratório (12 horas ciclo claro/escuro, temperatura constante em 23 ± 2 °C e humidade relativa em 55%), com acesso livre para água filtrada [para coliformes fecais e metais pesados (Jojaco® modelo j190, Capivari de Baixo, SC, Brasil)] e alimentação padrão do laboratório [*ad libitum* (Biobase®, Águas Frias, SC, Brasil)]. Os animais foram alojados aleatoriamente em caixas de plástico (27x36x31 cm) com no máximo 3 animais cada, da qual foi coberto por maravalha e alocados em racks ventilados para roedores. Todos os procedimentos e protocolos experimentais realizados no presente estudo foram elaborados com o intuito de utilizar o mínimo de animais necessários em conformidade com a Lei federal 11.794 do ano de 2008.

3.2 PROTOCOLO DE AQUISIÇÃO DE DADOS

Para mensuração do ECG sobre os animais em estado acordado, desenvolvemos previamente uma jaqueta personalizada para a circunferência

torácica média dos animais da qual foi produzida em tecido brim com elastano (3% elastano e 97% algodão) e três tiras de velcro (Figura 10B). A aquisição do sinal eletrocardiográfico sobre os animais foi realizada através de três eletrodos que foram alocados internamente na jaqueta e posicionados na derivação DI em todos os animais em estado acordado e anestesiado (Figura 10A). Os eletrodos foram confeccionados a partir de eletrodos descartáveis adultos (Eletrodos Maxicor®, Maxicor Produtos Médicos Ltda., Pinhais, Paraná, Brasil). Os eletrodos foram recortados em formato circular (20 mm de diâmetro aproximadamente) para posicionamento nas derivações pertinentes (Figura 11). Assim, a jaqueta permitiu uma melhor fixação dos eletrodos sobre a pele dos animais, dificultando consequentemente a interferência de possíveis ruídos de contato entre o eletrodo e o corpo do animal. Além disso, os animais foram também cuidadosamente raspados nas áreas de posicionamento dos eletrodos, devido os pelos provocarem possíveis condições de interferência sobre os sinais registrados; isto reduziu ainda mais as prováveis interferências de ruídos e artefatos.

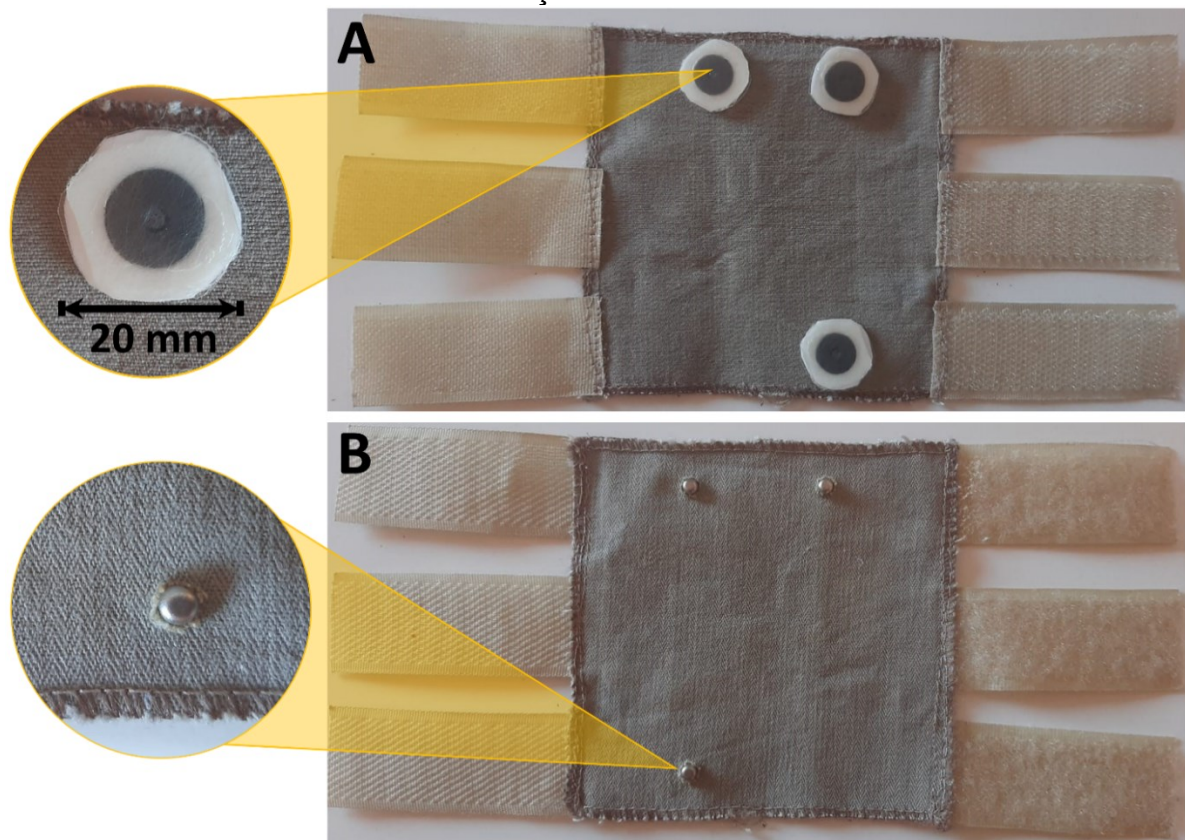
Figura 10 - Representação geral do sistema de registro do ECG para mensuramento no estado anestesiado e acordado.



(a) Posicionamento dos eletrodos sobre o corpo do animal anestesiado, (b) representação da jaqueta personalizada para a aquisição do sinal no animal acordado e (c) Configuração geral do sistema de registro do ECG.

Fonte: Produção do próprio Autor (2020).

Figura 11 - Jaqueta personalizada para a aquisição do sinal de ECG no animal na condição acordado.

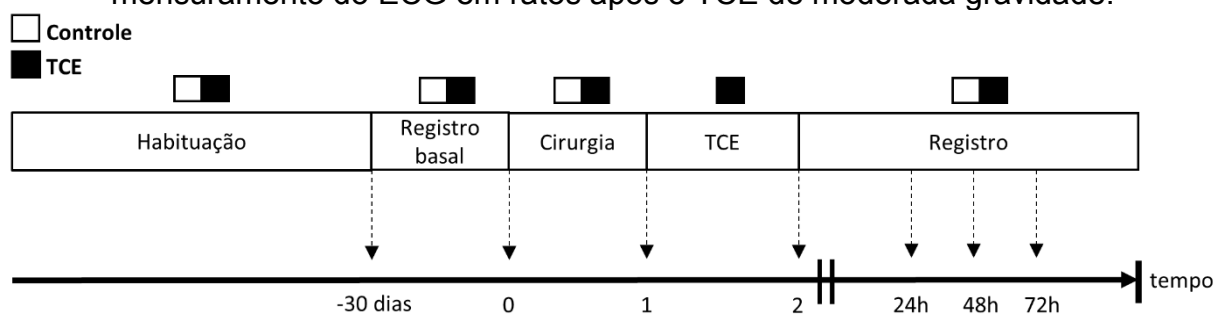


(a) Vista interior e (b) vista exterior.
Fonte: Produção do próprio Autor (2020).

Os animais permaneceram vestidos dentro da jaqueta através de um protocolo experimental elaborado previamente aos registros. Primeiramente, os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de habituação particularmente como grupo controle (n=5 [craniectomia para implantação da cânula do TCE]) e grupo TCE (n=5 [craniectomia para implantação da cânula do TCE e impacto do fluido]). Posteriormente, os animais foram habituados em uma caixa de vidro (30x20x23 cm) com cobertura aberta juntamente com a jaqueta de registro anteriormente desenvolvida, durante um período de trinta (30) dias intercalados em um tempo de 60 minutos por dia para cada animal. Em detalhamento das adaptações, a jaqueta foi posicionada horizontalmente na lateral da caixa e fechada pelas tiras de velcro (máxima abertura). Na frente da jaqueta, também foi colocado um pelete cilíndrico de ração (15 mm de diâmetro e 30 mm de comprimento), de modo a induzir a entrada do animal para dentro da jaqueta. Subsequentemente, o animal foi cuidadosamente transferido para a caixa de vidro, com livre acesso para se

movimentar e caminhar. A maneira de indução para que o animal adentrasse a jaqueta ocorreu efetivamente por meio do pelete de ração e gentilmente conduzido pelas mãos, ou seja, uma vez que o animal entrou dentro da jaqueta, as tiras de velcro foram imediatamente fechadas e o animal permaneceu apenas em observação (Figura 10C). Conforme estes processos se repetiam durante as adaptações, os animais foram aumentando seu tempo alocados na jaqueta (15 minutos por semana), bem como foi diminuindo seus movimentos e agitação dentro da caixa de vidro. Ao final das habituações, os animais foram conduzidos para os registros basais do ECG previamente ao TCE por LPF. Inicialmente no período da manhã, os animais foram submetidos à raspagem para colocação dos eletrodos de superfície e anestesiados individualmente sob administração de isoflurano (2,5% misturado com 100% de oxigênio) e imediatamente iniciado a realização dos registros de ECG. Após as avaliações basais sobre os animais anestesiados, os mesmos foram retornados para suas caixas para recuperação da consciência (um mínimo de 3 horas). Ainda no mesmo dia no período da tarde, os animais foram conduzidos para a avaliação basal em estado acordado (sem influência cirúrgica ou anestésica) com o novo método desenvolvido de registro do ECG. Um dia após as avaliações basais em estado acordado e anestesiado, os animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos (implantação da cânula para o LPF). No dia seguinte após a cirurgia, os animais foram suturados (grupo controle) e induzidos ao TCE pelo modelo de LPF (grupo TCE). Posteriormente, os animais foram avaliados (registro do ECG) novamente em vinte e quatro (24), quarenta e oito (48) e setenta e duas (72) horas com o novo método, idêntico as avaliações basais (Figura 12). Imediatamente após o término de todas as avaliações, os animais foram submetidos a eutanásia conforme protocolo experimental estabelecido.

Figura 12 – Linha do tempo do protocolo experimental desenvolvido para o mensuramento do ECG em ratos após o TCE de moderada gravidade.

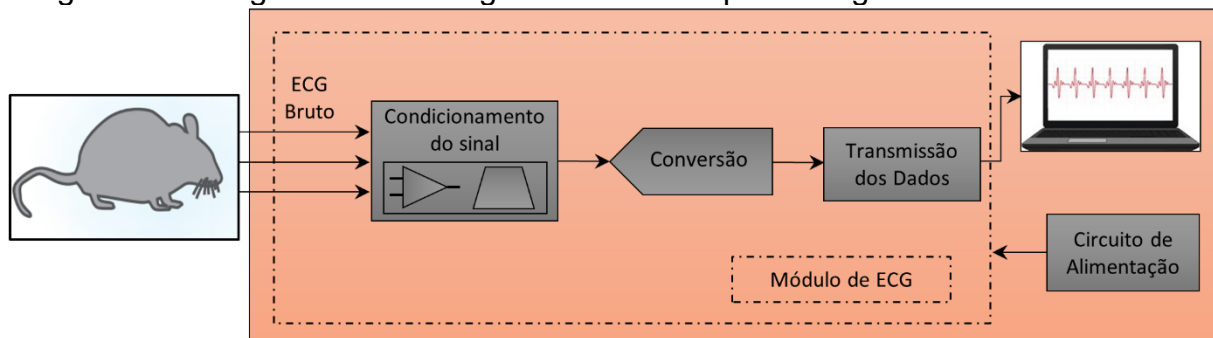


3.3 ARQUITETURA DO SISTEMA DE REGISTRO DO ECG

3.3.1 Sistema Geral

O sistema completo de registro do ECG em ratos pode ser subdividido em quatro blocos principais: condicionamento do sinal, encarregado de amplificar, filtrar e ajustar o sinal; conversão, responsável pela digitalização dos dados para que seja possível realizar o processamento posteriormente; transmissão dos dados, que realiza o recebimento dos dados e a comunicação com o computador na qual os dados serão armazenados e por fim o circuito de alimentação, incumbido de alimentar todos os blocos envolvidos no módulo de ECG. Nesta perspectiva, uma concepção geral do sistema pode ser visualizada na Figura 13.

Figura 13 – Diagrama de bloco geral do sistema para o registro do ECG em ratos.



Fonte: Produção do próprio Autor (2020).

3.3.1.1 Circuitos de Condicionamento do Sinal

Inicialmente, os dados brutos coletados pelos eletrodos de superfície acoplados ao animal, foram recebidos em um amplificador de instrumentação (INA129, Texas Instruments Inc., Texas, EUA) específico para este tipo de aplicação de sinal de baixa amplitude, com ganho fixo máximo sem distorcer o sinal ($G=92,48$) calculado de acordo com a Equação (1) disponibilizada pelo fabricante, onde o valor de R_g determina o ganho a ser atribuído no sinal. Posteriormente o sinal foi condicionado utilizando dois filtros analógicos, sendo um primeiro passa-alta de primeira ordem com frequência de -3 dB de $0,5$ Hz e ganho unitário, que eliminou as componentes de baixa frequência que não eram de interesse do sinal (e.g.,

respiração, ruídos DC de contato entre o eletrodo e a pele do rato) e um filtro passa-baixa de 4ª ordem do tipo *Butterworth*, com frequência de -3 dB de 40 Hz, com ganho fixo no primeiro estágio ($G=1.15$) e no segundo ($G=2.235$), que eliminou as componentes de alta frequência que não eram da banda de interesse do sinal. Subsequentemente, colocamos um circuito de ganho com ajuste variável ($G=1-11$), como forma de visualizar melhor o sinal no momento do registro, em virtude da baixa amplitude encontrada no sinal do ECG de ratos.

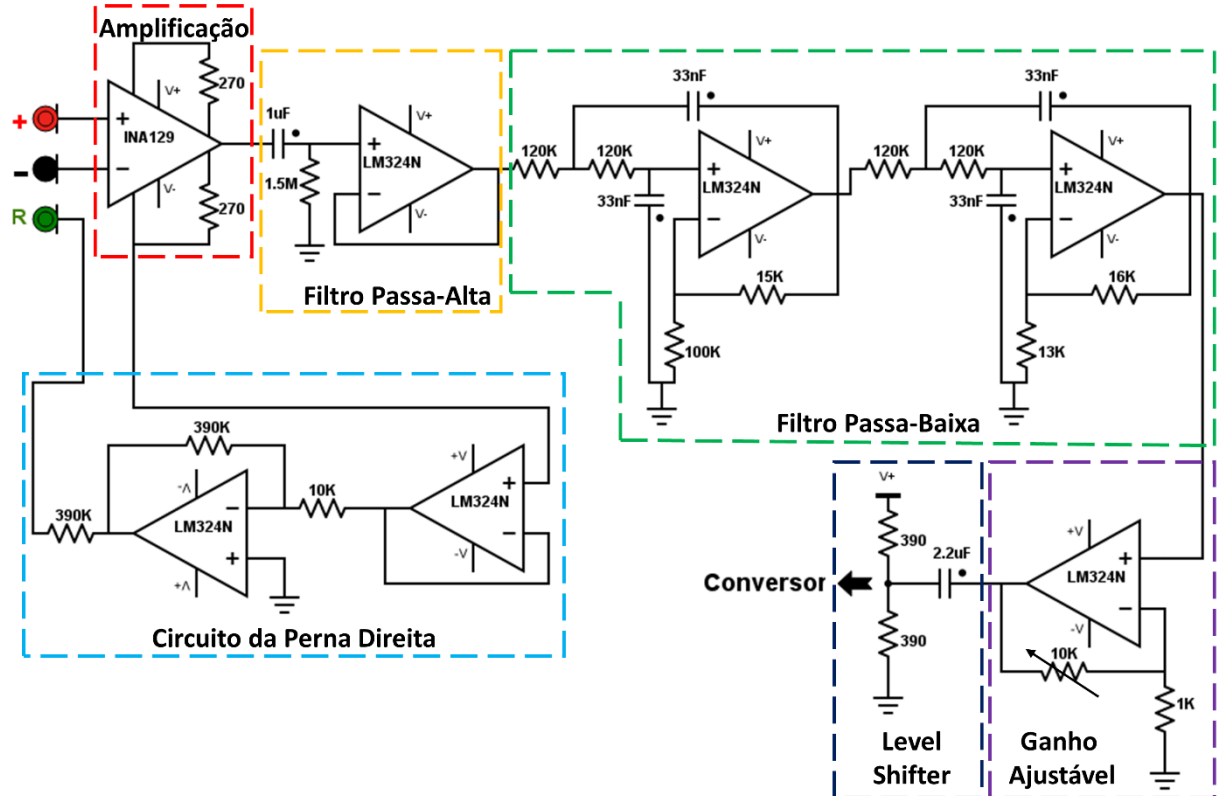
Para a digitalização do sinal com o conversor A/D, foi incluído um circuito *level shifter* para o deslocamento do sinal, uma vez que o conversor aceitava apenas uma variação de 0 a 5 V positivamente na entrada. Deste modo, o sinal foi elevado para 2.5 V, a fim de garantir apenas tensão positiva na entrada do conversor A/D. Adicionalmente, incluímos o circuito da perna direita como forma de minimizar os possíveis ruídos de interferência (modo comum), da qual o animal, os eletrodos ou mesmo os cabos poderiam estar susceptíveis. Todos os circuitos condicionadores projetados foram implementados utilizando amplificadores operacionais (LM324N, Texas Instruments Inc., Texas, EUA). O diagrama geral de cada bloco correspondente ao condicionamento do sinal é representado na Figura 14.

$$G = \frac{49.4k\Omega}{R_G} + 1 \quad (1)$$

É importante ressaltar que além de todo o condicionamento implementado sobre o sinal, alguns detalhes tanto na construção da jaqueta de aquisição quanto do sistema, foram determinantes para a aquisição do sinal eletrocardiográfico adequado sobre os animais. Dentre estes, é possível destacar a rigidez do tecido escolhido (brim com elastano [3% elastano e 97% algodão]). A qual possibilitou com que os eletrodos permanecessem posicionados em região fixa sobre os animais, minimizando consequentemente os possíveis ruídos de interferência do movimento do animal. Além disso, foi aplicado um gel para ECG (Ultra-Gel Eletro, MultiGel Ind. E Com. Importação e Exportação de Produtos para Saúde Ltda., Silvianópolis, Minas Gerais, Brasil) sobre o gel sólido do eletrodo descartável, melhorando o acoplamento condutivo entre o eletrodo e a pele do animal. Para aquisição dos sinais, foi utilizado cabos condutores de chumbo (Herald Technologies Inc., Florence, Carolina do Sul, EUA), com conectores na ponta do tipo botão de pressão. Além de ser flexível, este

cabo possui blindagem em borracha, a qual isolou possíveis interferências eletromagnéticas.

Figura 14 – Circuito esquemático geral do bloco de condicionamento do sinal.

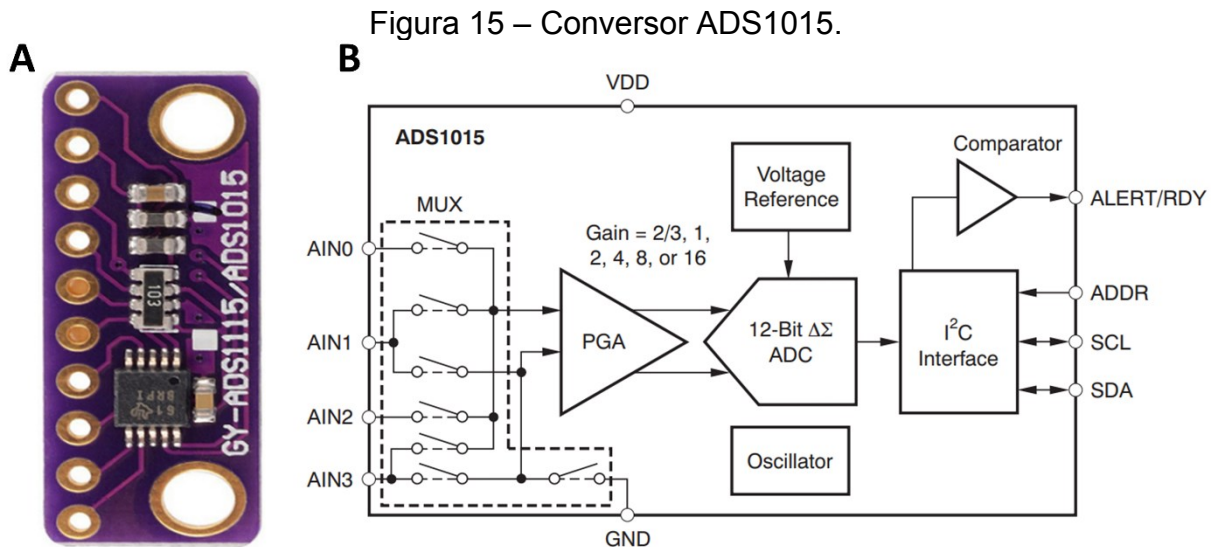


Fonte: Produção do próprio Autor (2020).

3.3.1.2 Conversão dos Dados

Após os dados passarem pelo bloco de condicionamento, o mesmo foi digitalizado por um conversor analógico-digital (A/D) de 12-bit de resolução (ADS1015, Texas Instruments Inc., Texas, EUA). Este conversor apresenta capacidade de conversão com taxa de dados de até 3300 amostras por segundo, utilizando topologia sigma-delta (alta precisão de conversão). Possui resolução adequada para digitalização de sinais biomédicos, oferecendo comunicação com diversas plataformas de desenvolvimento microcontroladas. Embora este conversor possua 4 canais de entrada de sinais para conversão, foi utilizado apenas 1 canal. O mesmo realizou a transferência dos dados para a plataforma de desenvolvimento Arduino nano, através de comunicação por interface I²C. O módulo do dispositivo, bem

como o digrama de configuração da sua pinagem podem ser vistas nas Figuras 15A e 15B, respectivamente.



Fonte: *Datasheet ADS1015 (Texas Instruments Inc.)*

3.3.1.3 Transmissão dos Dados

Tendo em vista a miniaturização na construção do sistema, bem como a portabilidade associada aos blocos do sistema proposto inicialmente, foi escolhida a plataforma de desenvolvimento Arduino Nano (Arduino Nano v.3.0, San Jose, California, EUA) no intuito de transmitir os sinais que eventualmente fossem registrados.

Tabela 1 – Principais características da plataforma Arduino Nano.

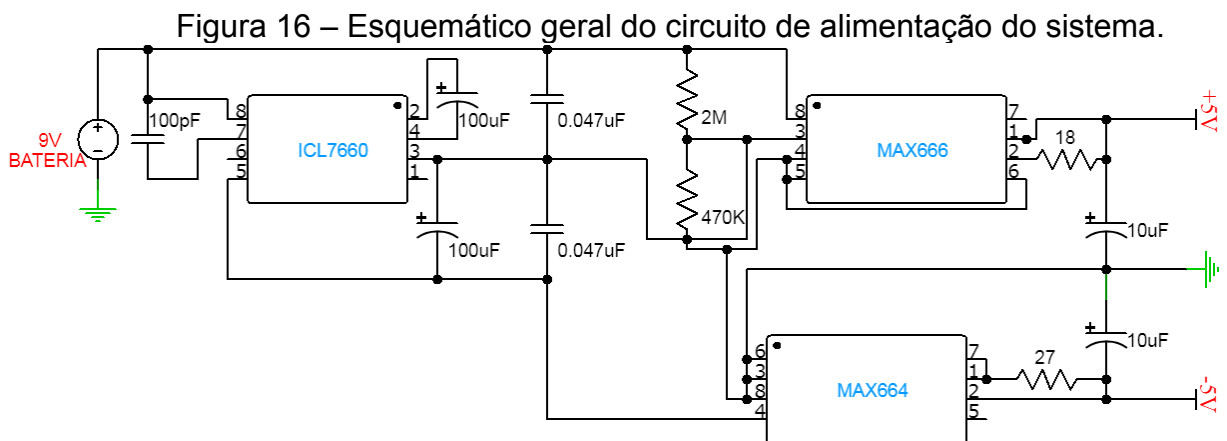
Características	Descrição
Microcontrolador	ATmega328P
Pinos Digitais	14 (6 PWM)
Pinos Analógicos	8
Velocidade do <i>Clock</i>	16MHz
Memória <i>Flash</i>	32 kbytes
RAM	2 kbytes
EEPROM	1 kbyte
Conversor A/D	10 bit
USB	1
SPI	2
I2C	1
Peso	7g
Dimensões	18X45 mm

Fonte: ARDUINO (2020).

Esta foi responsável por ler os dados recém digitalizados pelo conversor e transmiti-los a um computador para o armazenamento. O processo de comunicação dos dados entre o computador e o Arduino foi realizado através de conexão por porta universal (USB, do inglês *'universal serial bus'*). Além disso, foi definido ainda uma taxa de amostragem de 500 Hz fixa para a transmissão dos dados entre a plataforma Arduino e o computador, respeitando os limites aceitáveis para a melhor amostragem do sinal do ECG delimitado para ratos (NAZERAN, 2006). A Tabela 1 apresenta as principais especificações associadas a esta plataforma.

3.3.1.4 Circuito da Fonte de Alimentação

Para a alimentação dos blocos que compõem o sistema completo de registro de ECG em ratos, implementamos um circuito de alimentação com bateria de 9V (Figura 16). Utilizamos no circuito como um todo um total de 3 CI (Circuitos Integrados) de reguladores de tensão. Inicialmente, utilizamos um CI inversor de tensão (ICL7660, Renesas Technology Corporation, Koto, Tóquio, Japão) na entrada de modo a receber os +9 V da bateria.



Posteriormente utilizamos mais dois CI's reguladores de tensão, sendo um com saída para 5 V positivamente (MAX666, Maxim Integrated Products, San José, Califórnia, EUA) e um outro com saída para 5 V negativamente (MAX664, Maxim Integrated Products, San José, Califórnia, EUA) de acordo com a necessidade do sistema, ambos específicos para aplicação com bateria. Todos os circuitos foram

implementados em conjunto com alguns componentes passivos (resistores e capacitores) conforme sugerido pelos fabricantes, para maior redução do ruído e melhor desempenho dinâmico. Visando a diminuição do ruído de interferência no sinal de ECG de animais (sinais de baixa amplitude), bem como a alimentação simétrica dos circuitos utilizados no sistema, descartamos inicialmente o uso da alimentação direta da plataforma Arduino.

3.4 TCE INDUZIDO PELO MODELO DE LPF PARASSAGITAL

Logo após 24 horas do registro basal do ECG realizado nos animais, o modelo de LPF foi aplicado conforme reportado anteriormente; no entanto com algumas pequenas modificações (FIORIN *et al.*, 2016, 2018). Os animais foram inicialmente anestesiados com cetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) em injeção única intraperitoneal e transferidos para o dispositivo estereotáxico. Posteriormente foi realizado uma craniectomia de 3 mm de diâmetros, exatamente a 2 mm posterior ao bregma e 3 mm lateral à linha média, dando-se atenção para manter a dura-máter intacta. Logo depois, foi cimentado uma cânula de lesão plástica sobre a craniectomia previamente realizada com superbonder (gel) e foi preenchido o escalpo em torno da cânula com cimento dental. Imediatamente após endurecer o cimento dental, a cânula foi preenchida com solução salina (0,9%) e fechada com tampa plástica adequada. Os animais foram então removidos do dispositivo estereotáxico e transferidos gentilmente de volta para sua caixa para cuidados pós-operatórios. Após o decorrer de 24 horas, os animais foram anestesiados com isoflurano (1% inalado) e acoplados a cânula no dispositivo de percussão de fluido. O TCE foi então induzido por um breve pulso de fluido de pressão sobre a dura-máter exposta. Este pulso de pressão foi mensurado extracranialmente usando um módulo de sensor de pressão absoluta digital (MS5803-14BA, Hampton, Virginia, EUA), conectado ao dispositivo de LPF. Os dados foram lidos digitalmente em uma plataforma de desenvolvimento Arduino (Arduino Due, San José, Califórnia, EUA) através de comunicação por interface I²C acoplado ao sensor. A plataforma Arduino transmitiu os dados para um computador por conexão USB, onde os dados foram armazenados para análise posterior. Os dados foram amostrados a uma taxa de 1000 Hz entre o sensor e o computador, da qual se mostrou suficiente para mensurar a pressão exata no momento do impacto do

fluido sobre o crânio do animal. Embora este sensor de pressão venha calibrado de fábrica, foram implementadas bibliotecas disponibilizadas pelo fabricante para calibração, de modo que efetuasse a calibração do sensor a cada coleta de dados iniciada, minimizando inicialmente erros de estabilidade do sistema nos dados obtidos. Um pulso de pressão de 2.0 ± 0.2 ATM foram registrados no momento do impacto da lesão, sugerindo um TCE de gravidade moderada induzido neste modelo experimental. Os animais associados ao grupo controle foram sujeitos a todos os procedimentos de maneira idêntica, exceto ao modelo de LPF. Após o término de todos os procedimentos experimentais, os animais foram anestesiados novamente sob isoflurano (1% inalado) e a cânula com cimento dentário foi removida. Subsequentemente, foi colocado um grampo cirúrgico no local da incisão, sendo os animais reanestesiados com cone nasal de anestesia, que foi retirado após a conclusão do procedimento.

3.5 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

Para análise da VFC sobre os animais em estado anestesiado e acordado, inicialmente registramos uma amostra (8-10 minutos) de cada animal em cada estado, conforme protocolo experimental desenvolvido. Além disso, foi permitido que os animais se adaptassem por um período de 20 minutos, antes que os registros efetivamente se iniciassem. Após o término dos registros, os sinais foram posteriormente inspecionados visualmente na busca por artefatos de movimento, eventos de arritmias ou batimentos ectópicos que porventura poderiam prejudicar o processamento dos dados para obtenção da VFC. Desta forma, selecionamos um período de 5 minutos de cada amostra registrada, desprovida ao máximo de ruídos para o processamento de extração dos parâmetros da VFC. O sistema de registro do ECG previamente desenvolvido, forneceu os dados dos animais como pontos de amplitude do ECG dos ratos em arquivo de texto (.txt), os quais foram armazenados em um computador para posterior análise. Para avaliar os parâmetros da VFC, os dados foram manipulados por aplicativo de software personalizado HRVtool (HRVtool, Greifswald, MV, Germany, versão 1.03) usando Matlab (MathWorks Inc, Natick, MA, USA, versão 8.5). Embora os sinais já tinham sido filtrados analogicamente, foi efetuado a filtragem digital (filtro passa banda [0.1-40 Hz]) novamente a fim de garantir

a confiabilidade nos dados obtidos. Para extração dos parâmetros dos sinais de variabilidade, foi utilizado as principais métricas lineares e não lineares da VFC no domínio do tempo (frequência cardíaca, média NN, SDNN, RMSSD, SD1, SD2 e SD1/SD2) e no domínio da frequência (LFnu, HFnu e a razão LF/HF), conforme relatado anteriormente.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. A análise de dados foi conduzida, utilizando a análise de variância (ANOVAs) de duas vias e o teste t de *student*. Aplicamos o modelo de ANOVA de medidas repetidas para verificar o efeito do TCE e o teste t pareado para avaliar o efeito da anestesia com administração de isoflurano. Teste múltiplo Sidak's comparando os grupos foi aplicado para análise *post hoc* quando apropriado. Um valor de $p < 0.05$ e $p < 0.01$ foram considerados estatisticamente significantes. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA, versão 8.0).

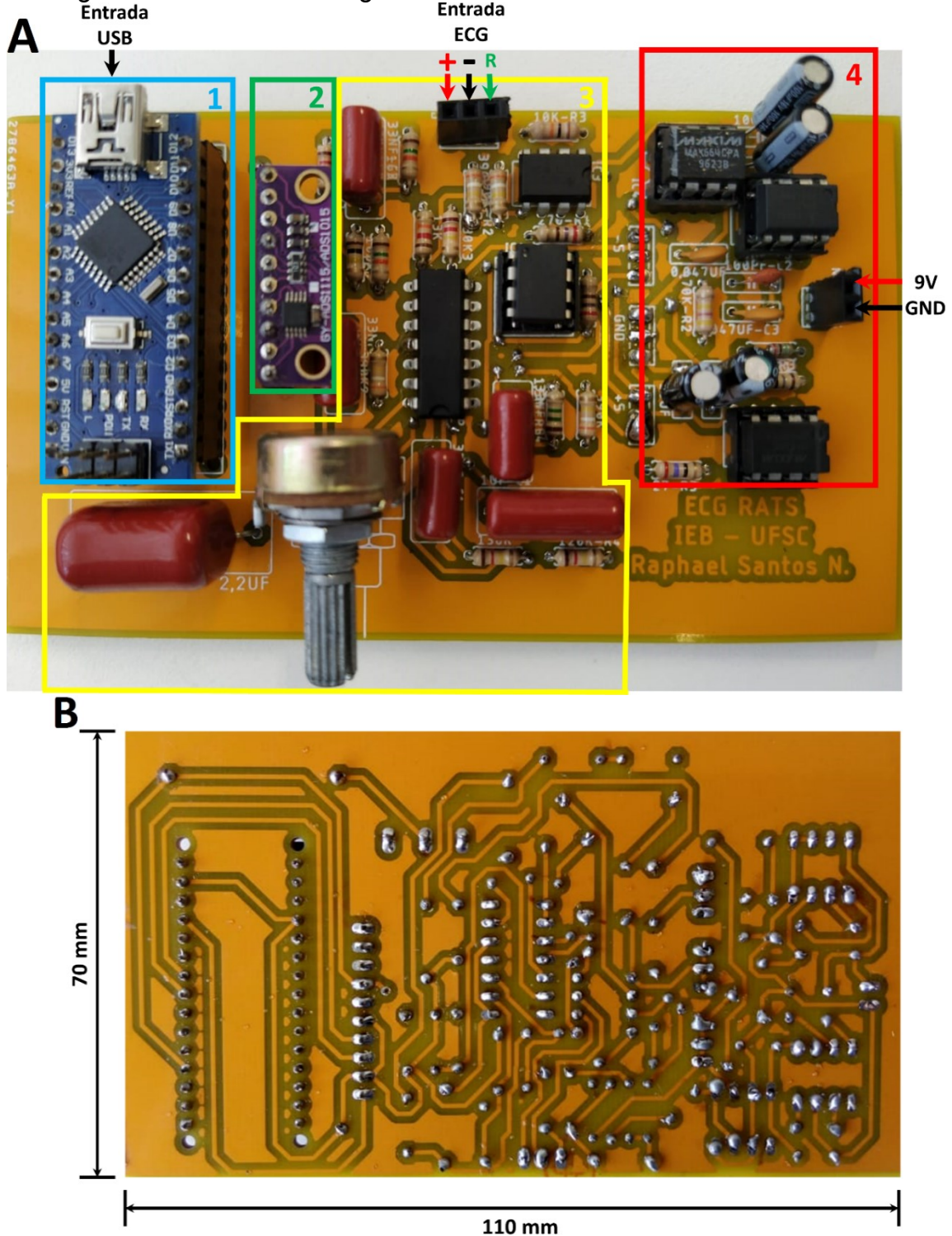
4 RESULTADOS

4.1 SISTEMA DE REGISTRO DO ECG

O sistema proposto inicialmente na seção 3.3.1 pode ser visto na Figura 17. Os blocos que constituíam o sistema completo de registro do ECG foram integrados em uma única placa de circuito impresso (PCI). Destaca-se na figura cada região correspondente a cada bloco do sistema proposto anteriormente, bem como a entrada para os cabos de derivação do ECG dos animais, USB e para a entrada da bateria de 9 volts. Após a finalização da integração dos circuitos eletrônicos na PCI, também foi elaborado uma caixa personalizada (80 x 125 x 100 mm) para o encapsulamento total do sistema, conforme ilustrado na Figura 18. Recortes para a saída dos cabos (cabos para eletrodos e USB) e para o controle de ajuste de ganho foram projetados sobre a caixa, bem como um suporte interno de apoio para a bateria. Além disso, foi utilizado 3 cabos condutores (60 cm de comprimento) com conectores na ponta do tipo botão

de pressão (Herald Technologies Inc., Florence, Carolina do Sul, EUA), específicos para aplicação com eletrodos de ECG, para captação dos sinais do ECG dos animais.

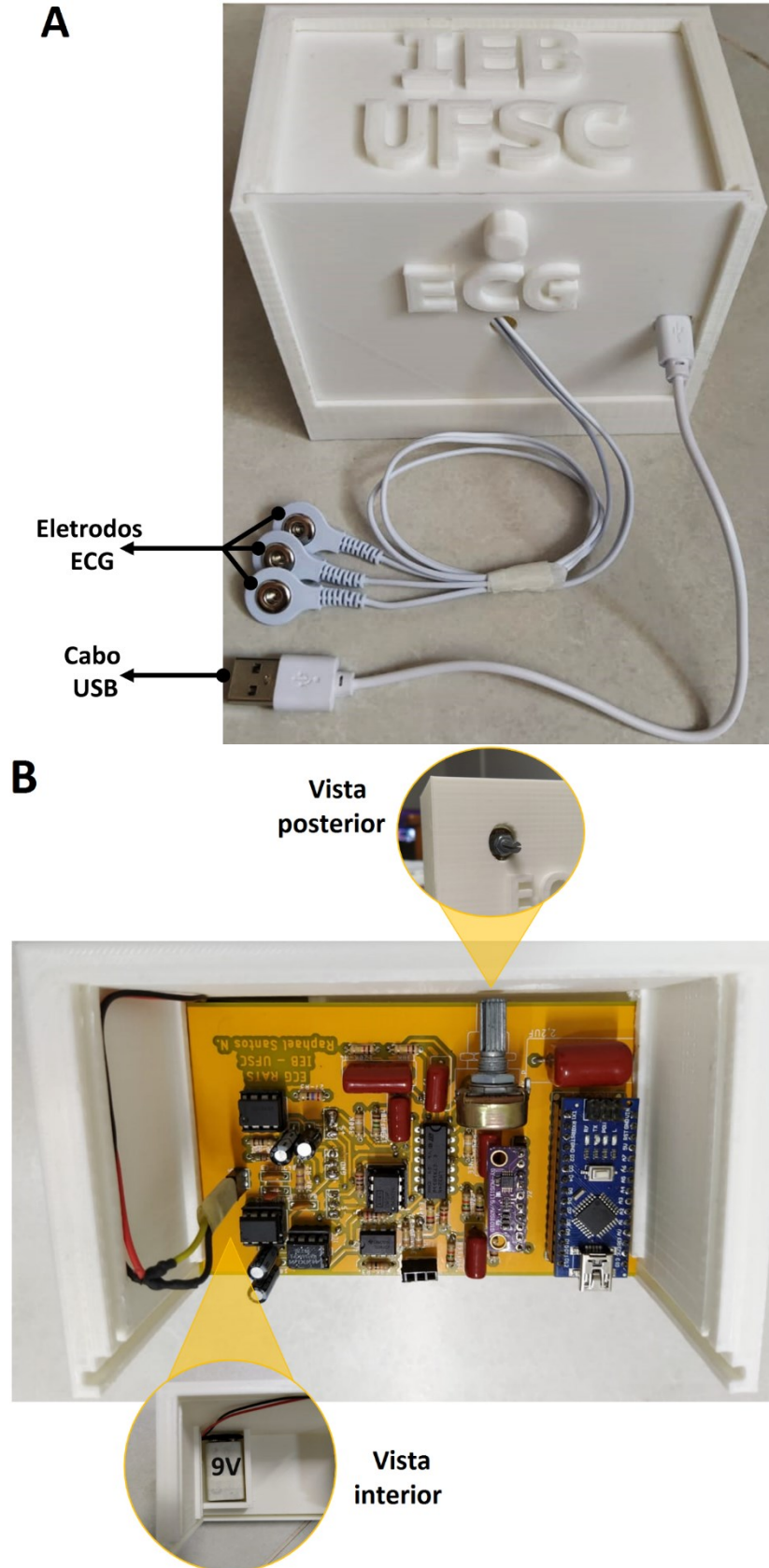
Figura 17 – Sistema de registro do ECG em ratos desenvolvido em PCI.



(A) Vista superior. (1) Circuito de transmissão dos dados, (2) circuito de conversão dos dados, (3) circuitos de condicionamento do sinal e (4) circuito da fonte de alimentação do sistema. (B) Vista inferior, com dimensões representadas.

Fonte: Produção do próprio Autor (2020).

Figura 18 - Versão final do sistema de registro do ECG em ratos desenvolvido.

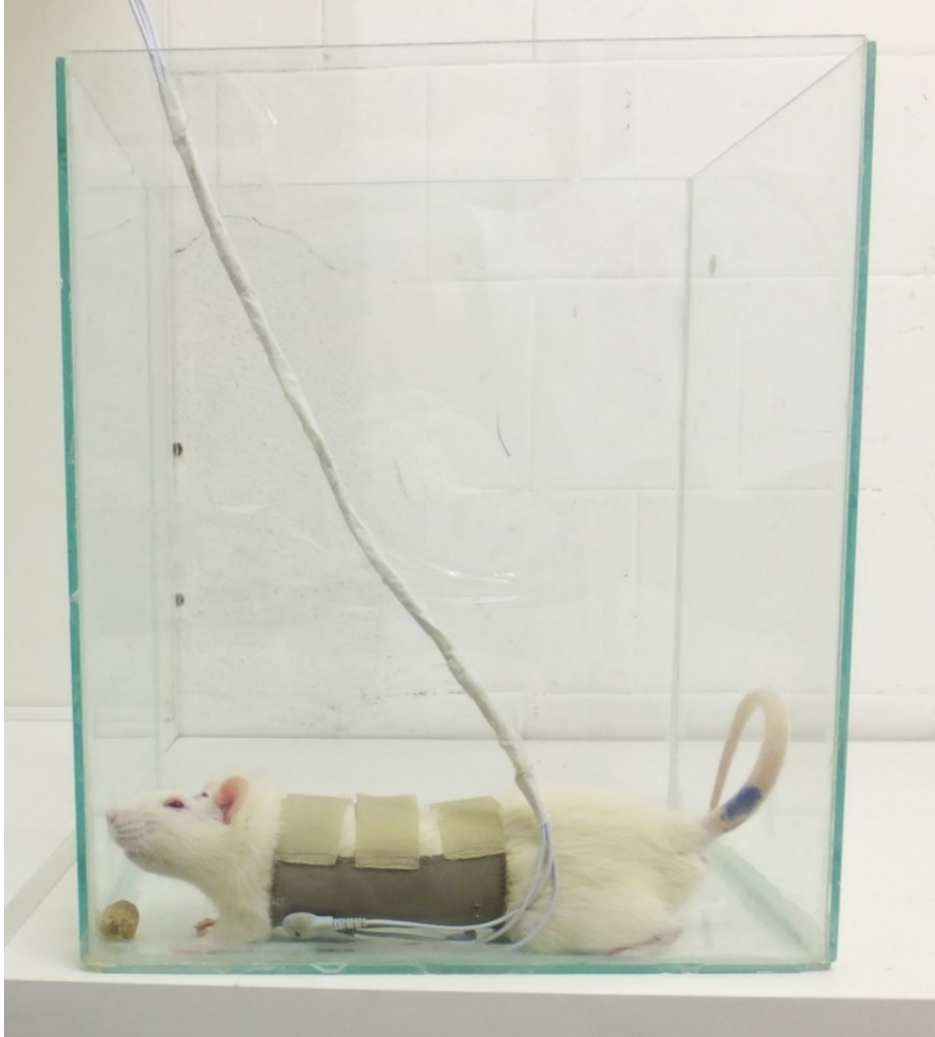


(A) Vista exterior do sistema, com panorama frontal. (B) Vista interior do sistema, com panorama superior.

Fonte: Produção do próprio Autor (2020).

A Figura 19 apresenta o setup de aquisição do ECG com o animal já habituado com a jaqueta. Conforme descrito anteriormente, a jaqueta foi posicionada na lateral da caixa de vidro (30 x 20 x 23 cm), juntamente com o pelete de ração, para induzir o animal a adentrar na jaqueta. É importante notar que o animal permanece visivelmente acordado, de olhos abertos e adentrado sobre a jaqueta previamente desenvolvida.

Figura 19 – Cenário de adaptação e aquisição do sinal do ECG.



Fonte: Produção do próprio Autor (2020).

4.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ANESTESIA POR ISOFLURANO SOBRE OS PARÂMETROS DA VFC

Embora a administração de anestesia por isoflurano seja amplamente utilizada em protocolos experimentais cardiovasculares, o seu uso para avaliação dos parâmetros da VFC tem sido controverso em razão da influência sobre a modulação

das vias simpáticas e parassimpáticas do SNA. Na primeira parte do protocolo experimental, foi avaliado os parâmetros da VFC com o novo sistema de registro do ECG, sob os animais na condição basal (sem TCE). Os resultados mostraram diferenças significativas entre os animais no estado anestesiado e acordado, apontando variações sobre todos os índices das séries temporais (Tabela 2).

Tabela 2 – Correlação dos parâmetros da VFC.

VFC Métricas n=10	Basal		DM/IC de 95%	P
	Anestesiado	Acordado		
Parâmetros no Domínio do Tempo				
FC (BPM)	309(15.05)	427.75(10.05)	118(88.74, 148.8)	**
Média NN (ms)	197.88(10.55)	140.88(3.42)	-57(-77.65, -36.35)	**
SDNN (ms)	7.49(1.71)	11.01(1.53)	3.53(-1.76, 8.81)	ns
RMSSD (ms)	9.58(2.05)	9.85(1.49)	0.27(-6.56, 7.10)	ns
SD1	6.76(1.44)	6.96(1.06)	0.2(-4.64, 5.04)	ns
SD2	6.84(1.22)	11.25(1.13)	4.41(1.27, 7.55)	*
SD1/SD2	0.98(0.12)	0.62(0.07)	-0.36(0.70, -0.02)	*
Parâmetros no Domínio da Frequência				
LFnu	28.89(2.12)	36.73(2.18)	7.84(2.58, 13.11)	**
HFnu	71.11(2.12)	63.27(2.18)	-7.84(-13.11, -2.58)	**
LF/HF	0.41(0.04)	0.59(0.06)	0.18(0.04, 0.32)	*

Os dados são representados como médias (erro padrão da média), salvo quando indicado. DM, diferença de média pareada; IC, intervalo de confiança com 95%; FC, frequência cardíaca; Média NN, média de todos os intervalos NN; SDNN, desvio padrão de todos os intervalos NN; RMSSD, raiz quadrada média das sucessivas diferenças dos intervalos NN; SD1, desvio padrão da variabilidade instantânea (curto prazo) dos intervalos NN; SD2, desvio padrão da variabilidade dos intervalos NN a longo prazo; SD1/SD2, razão entre o desvio padrão da variabilidade dos intervalos NN a curto e longo prazo; LFnu, componente de baixa frequência em unidade normalizada; HFnu, componente de alta frequência em unidade normalizada; LF/HF, razão absoluta entre LF e HF; BPM, batimentos por minuto; ms, milissegundos. A análise de dado foi conduzida usando teste t Student pareado. *p<0.05; **p<0.01; 'ns', não significativa (p>0.05), foram considerados estatisticamente significantes.

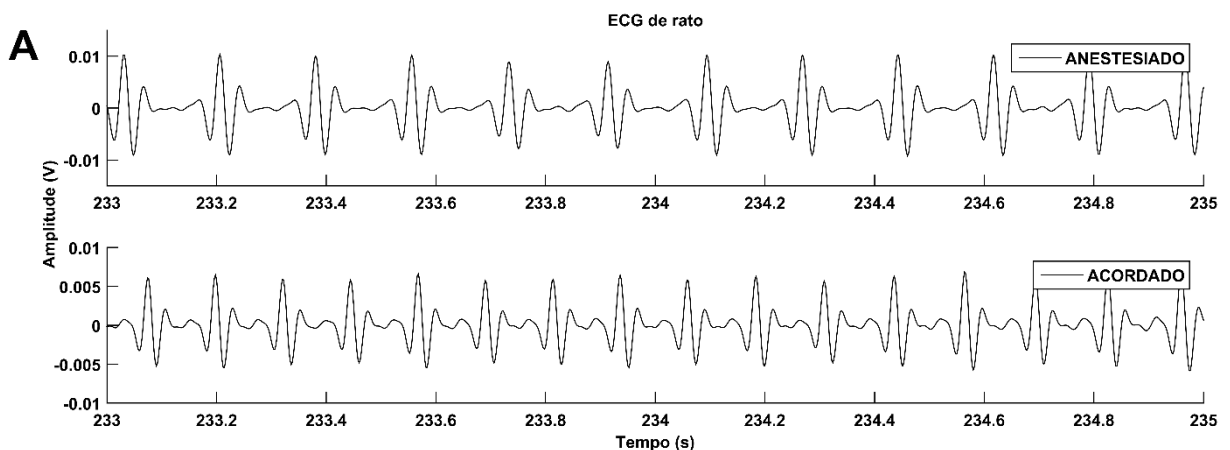
Fonte: Produção do próprio Autor (2020).

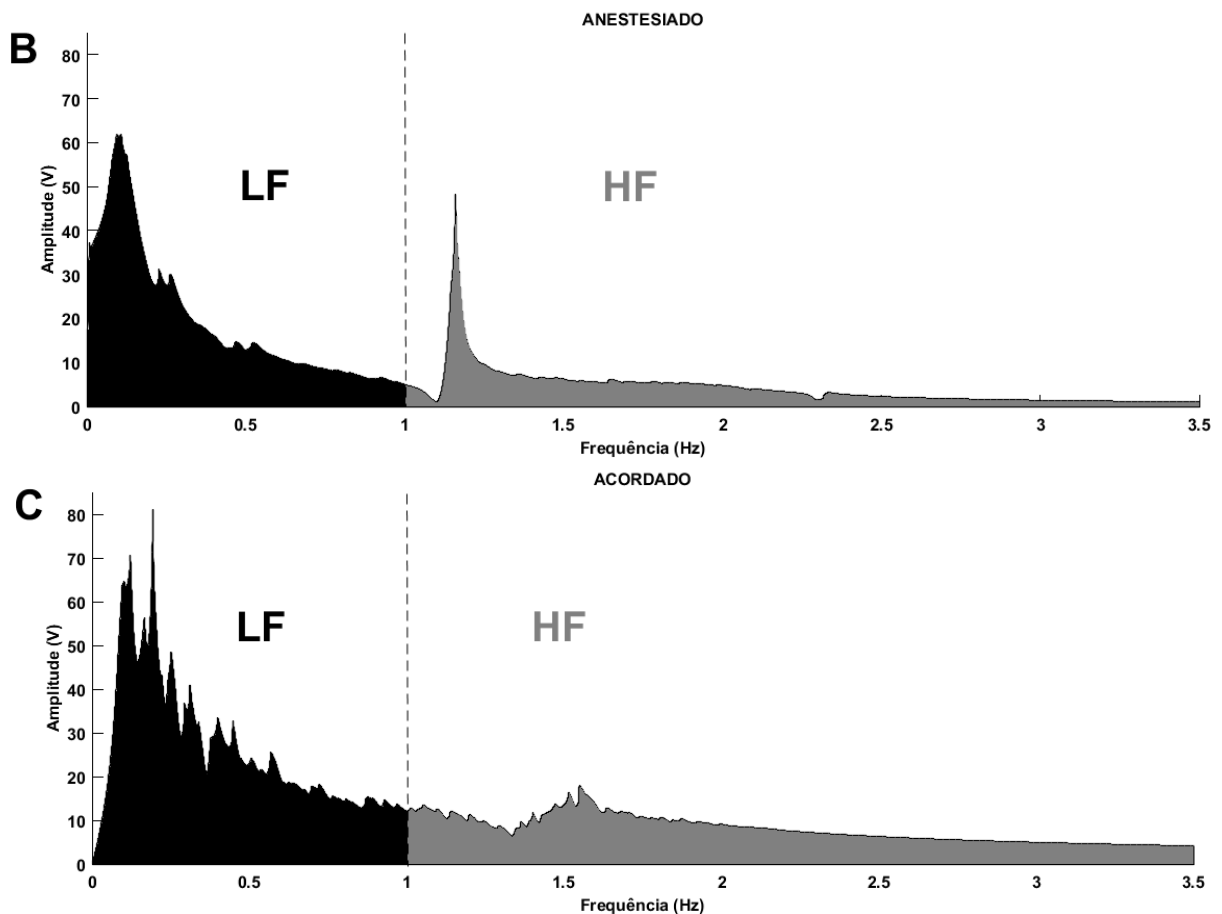
Em termos dos parâmetros da VFC no domínio do tempo, os achados foram estatisticamente diferentes para frequência cardíaca (p<0.01), média NN (p<0.01), SD2 (p<0.05) e a razão SD1/SD2 (p<0.05), entre animais no estado anestesiado e acordado. A métrica da frequência cardíaca indicou diminuição da VFC global, enquanto que as componentes SD2 e a razão SD1/SD2 sugeriram diminuição do balanço simpático-vagal, ambos no estado anestesiado. Em contrapartida, as componentes SDNN (p>0.05), RMSSD (p>0.05) e SD1 (p>0.05) não diferiram entre os animais anestesiados e acordados. Apesar do parâmetro SDNN não resultar em diferença estatisticamente significativa, foi possível observar uma redução em sua

correlação, principalmente no estado anestesiado. Do ponto de vista do domínio da frequência, os dados foram estatisticamente significantes entre todos os parâmetros mensurados (LFnu [$p < 0.01$], HFnu [$p < 0.01$] e a razão LF/HF [$p < 0.05$]), entre ambos os estados. Outro fator importante a ser ressaltado, é que a maioria dos índices da VFC medidos, tanto lineares quanto não lineares mostraram maior erro padrão da média para os animais em estado anestesiado, salvo nos parâmetros associados ao domínio da frequência (LFnu, HFnu e LF/HF).

Tendo em vista os parâmetros da VFC no domínio do tempo e da frequência medidos, também avaliamos o traçado do ECG (segmento de 2 s) com a finalidade de identificar o perfil das ondas do ECG, bem como a ritmicidade do sinal durante a administração de anestesia. Neste sentido, analisamos o traçado de ECG sobre um mesmo animal no estado anestesiado e acordado (Figura 20A). Os resultados experimentais obtidos revelaram uma perda significativa da ritmicidade global e um aumento na amplitude do sinal do ECG (± 0.005 V), após a administração do anestésico. Uma estimativa espectral de potência (série temporal de 5 minutos) usando algoritmo FFT também foi realizada sobre o registro de um animal em estado anestesiado (Figura 20B) e acordado (Figura 20C), no intuito de confirmar os achados encontrados nos parâmetros do domínio da frequência da VFC. Foi possível verificar que o espectro de frequência era predominantemente modulado por atividade do tônus simpático, entretanto foi influenciado fortemente por atividade induzida pelo tônus parassimpático.

Figura 20 – Representação do sinal de ECG no domínio do tempo e da frequência de um mesmo animal no estado basal.





(A) Segmento de 2 segundos no domínio do tempo em estados anestesiado e acordado. (B-C) Estimação espectral de potência usando algoritmo FFT, apresentando as bandas LF e HF. (B) Estado anestesiado e (C) acordado são representados.

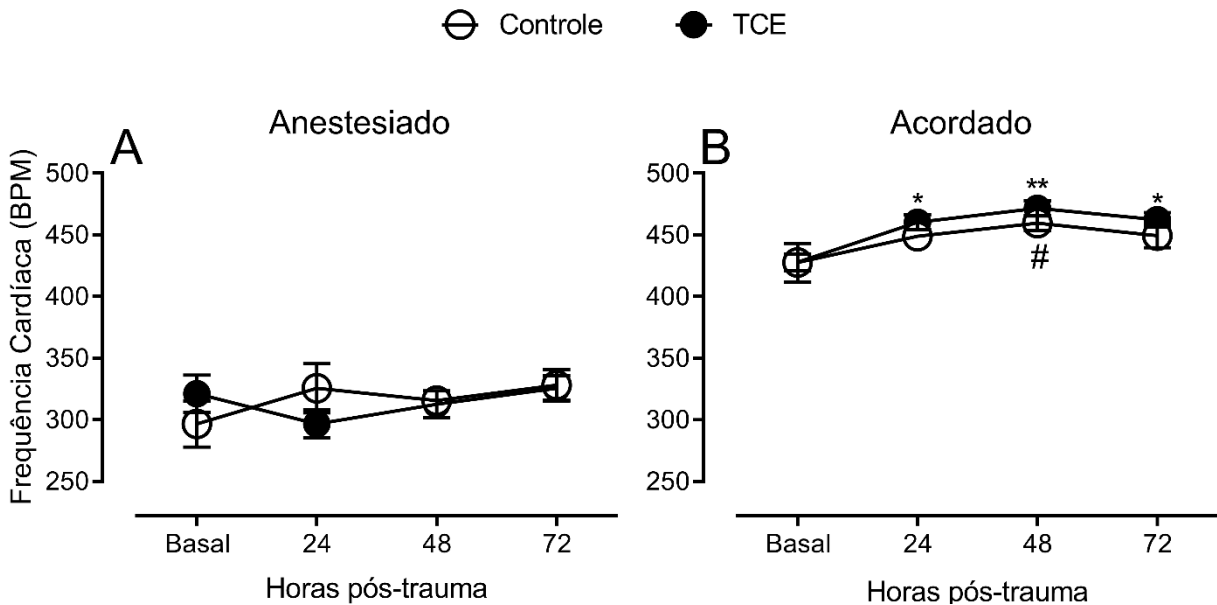
Fonte: Produção do próprio Autor (2020).

4.3 EFEITO DO IMPACTO DO TCE MODERADO SOBRE OS ANIMAIS EM ESTADO ANESTESIADO E ACORDADO

As métricas da VFC lineares e não lineares podem ser alteradas após TCE de qualquer severidade, principalmente em lesões mais severas (moderada e grave). Entretanto, em modelos de TCE com ratos este processo também pode ser prejudicado pela abordagem metodológica para registro do ECG dos animais (anestésico, cirurgia, entre outros). A Figuras 21A representada pela administração de isoflurano, revelaram que não existe diferença para a métrica de frequência cardíaca ($F[3,12] = 1.246$; $p > 0.05$). Ademais, além dos valores sob anestesia promoverem maior erro padrão da média experimentalmente. Por outro lado, a Figura 21B indicou que os animais em estado acordado tiveram forte atividade global da VFC em 24, 48 e 72 horas após TCE, expressada pela frequência cardíaca HR ($F[3,12]$

=6.119; $p < 0.01$). Quanto a análise post hoc, os dados dos animais em estado acordado evidenciaram um aumento da frequência cardíaca ($p < 0.05$) quando comparados com os registros basais. Além disso, o grupo controle no estado acordado apresentou diferença significativa no registro de 48 horas da frequência cardíaca em comparação com registro basal ($p < 0.05$).

Figura 21 - O efeito do procedimento cirúrgico e TCE sobre os parâmetros lineares da VFC no domínio do tempo sobre os animais em estado (A) anestesiado e (B) acordado.



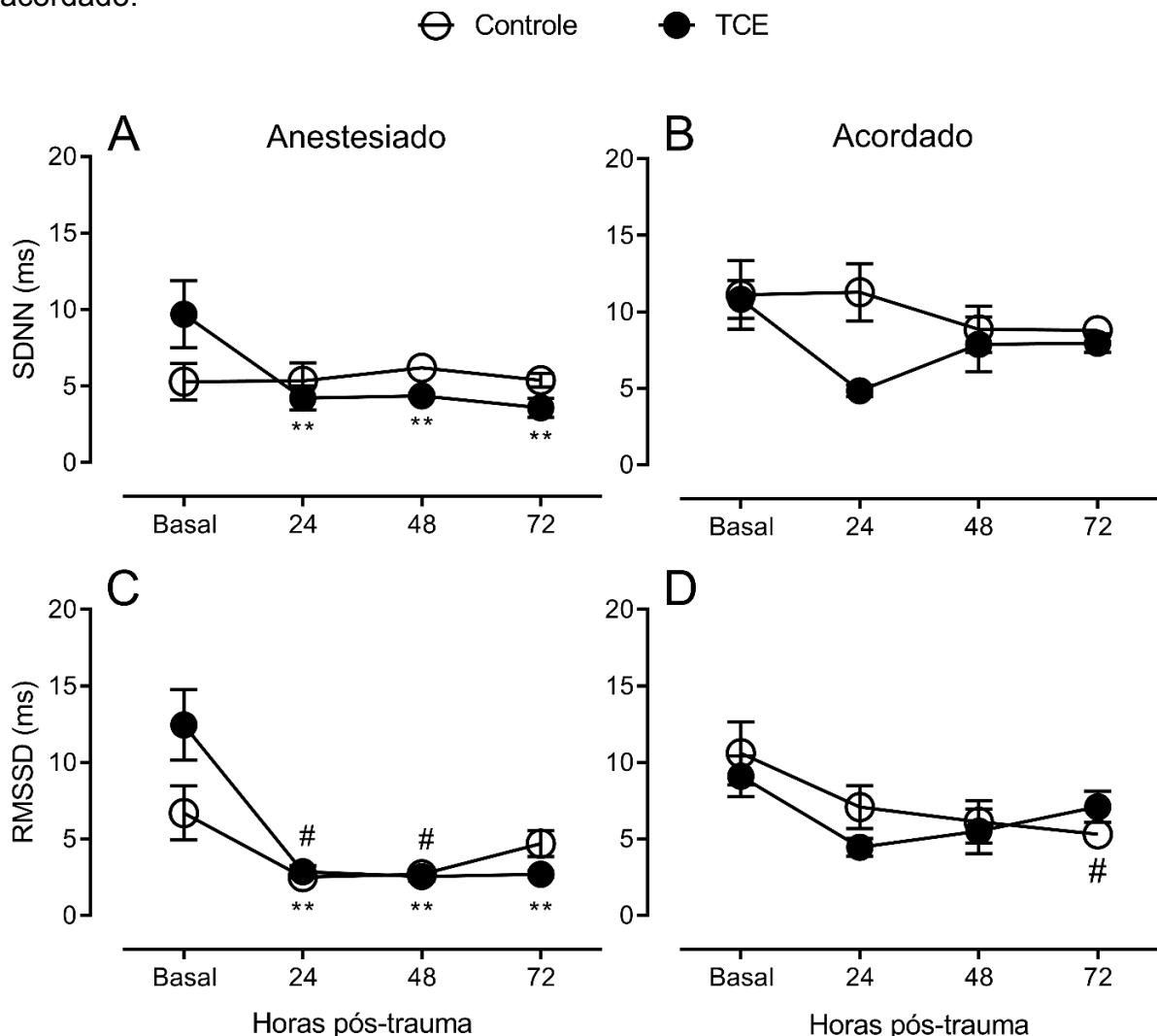
(A-B) frequência cardíaca. As análises de dados foram conduzidas usando ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Sidak múltiplo teste comparando os grupos foi aplicado quando apropriado. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média ($n=5$ por grupo). * $p < 0.05$ comparado com o basal (grupo TCE), ** $p < 0.01$ comparado com basal (grupo TCE) e # $p < 0.05$ comparado com o basal (grupo controle).

Fonte: Produção do próprio Autor (2020).

Em relação ao parâmetro RMSSD ($F[3,12] = 12.93$; $p < 0.01$) ilustrado na Figura 22C, a análise estatística demonstrou diferença significativa, enquanto que no parâmetro SDNN ($F[3,12] = 1.661$; $p > 0.05$) representado na Figura 22A, os dados não foram estatisticamente significante, ambos grupos controle e TCE sob anestesia. Apesar disso, a análise estatística entre os períodos registrados revelou diferença significativa sobre os dois parâmetros (SDNN e RMSSD) logo após 24, 48 e 72 horas no grupo TCE ($p < 0.01$) e no período de 24 e 48 horas sobre o grupo controle no índice RMSSD ($p < 0.05$). Em animais no estado acordado, os dados não desencadearam significativa interação de SDNN ($F[3,12] = 2.210$; $p > 0.05$) sobre o grupo TCE (Figura 22B). No entanto, cabe ressaltar que embora o índice SDNN não tenha sido

estatisticamente significativa, foi observado uma redução significativa nas primeiras 24 horas após indução do modelo de LPF. Em contraste, a Figura 22D indicou que a métrica RMSSD foi estatisticamente significativa ($F[3,12] = 8.399$; $p < 0.01$) no estado acordado em ambos os grupos. A análise post hoc sobre ambos os parâmetros (SDNN e RMSSD) não demonstraram significativas diferenças após TCE ($p > 0.05$). Ainda assim, o grupo controle expressou diferença sobre o índice RMSSD em 72 horas no estado acordado ($p < 0.05$).

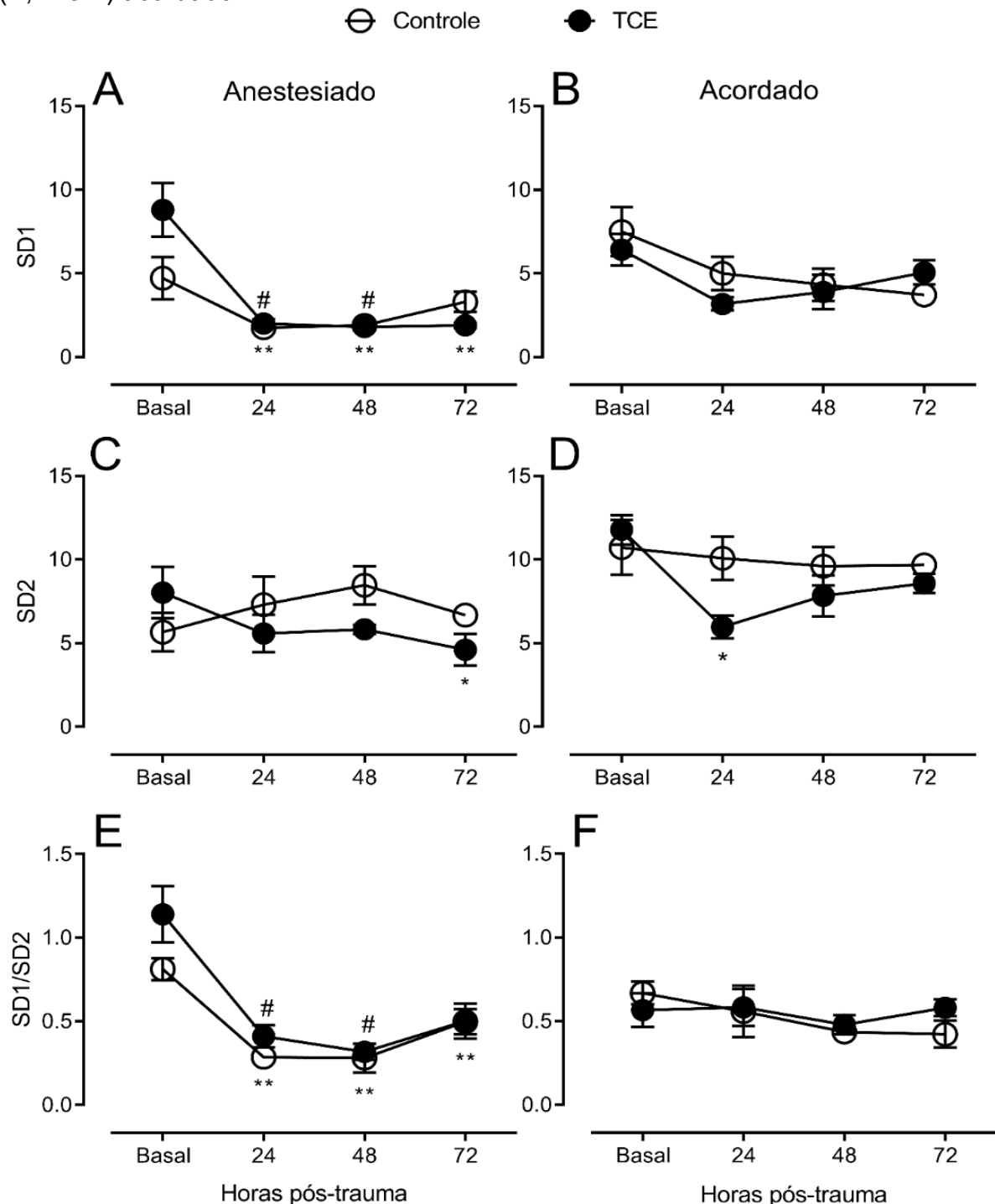
Figura 22 – O efeito do procedimento cirúrgico e TCE sobre os parâmetros lineares da VFC no domínio do tempo sobre os animais em estado (A-C) anestesiado e (B-D) acordado.



(A-B) SDNN, desvio padrão de todos os intervalos NN e (C-D) RMSSD, raiz quadrada média das sucessivas diferenças dos intervalos NN. As análises de dados foram conduzidas usando ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Sidak múltiplo teste comparando os grupos foi aplicado quando apropriado. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média ($n=5$ por grupo). * $p < 0.05$ comparado com o basal (grupo TCE), ** $p < 0.01$ comparado com basal (grupo TCE) e # $p < 0.05$ comparado com o basal (grupo controle).

Fonte: Produção do próprio Autor (2020).

Figura 23 - O efeito do procedimento cirúrgico e TCE sobre os parâmetros não lineares da VFC no domínio do tempo sobre os animais em estado (A, C e E) anestesiado e (B, D e F) acordado.



(A-B) SD1, desvio padrão da variabilidade (curto prazo) dos intervalos NN; (C-D) SD2, desvio padrão da variabilidade dos intervalos NN a longo prazo; (E-F) SD1/SD2, razão entre o desvio padrão da variabilidade dos intervalos NN a curto e longo prazo. As análises de dados foram conduzidas usando ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Sidak múltiplo teste comparando os grupos foi aplicado quando apropriado. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n=5 por grupo). *p<0.05 comparado com o basal (grupo TCE), **p<0.01 comparado com basal (grupo TCE) e #p<0.05 comparado com o basal (grupo controle).

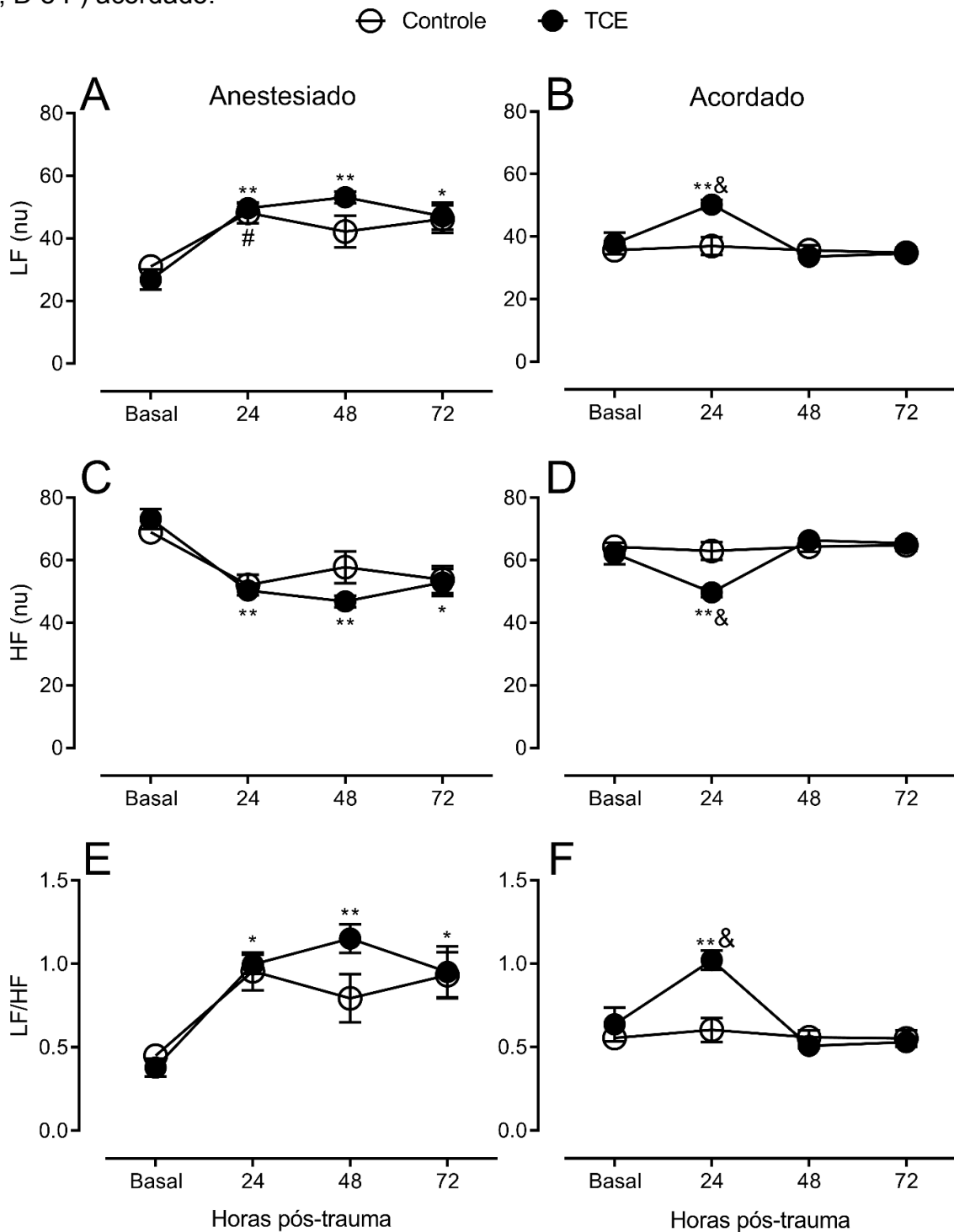
Fonte: Produção do próprio Autor (2020).

Nas Figuras 23A, 23C e 23E deste estudo, a análise estatística dos parâmetros não lineares da VFC demonstrou que existe diferença em todos os índices SD1 ($F[3,12] = 12.93$; $p < 0.01$; Figura 23A), SD2 ($F[3,12] = 5.361$; $p < 0.05$; Figura 23C) e a razão SD1/SD2 ($F[3,12] = 28.59$; $p < 0.01$; Figura 23E), em animais no estado anestesiado, respectivamente. Ademais, a análise estatística entre os períodos registrados indicou forte diminuição dos parâmetros SD1 (Figura 23A) e da razão SD1/SD2 (Figura 23E) após 24, 48 e 72 horas pós-TCE ($p < 0.01$), assim como na métrica SD2 (Figura 23C) em 72 horas em comparação com os registros basais, em animais anestesiados.

Em respeito ao grupo controle, os índices SD1 (Figura 23A) e SD1/SD2 (Figura 23E) foram significantes no período de 24 e 48 horas após TCE, quando comparado com o registro basal ($p < 0.05$), ambos em animais anestesiados. Embora SD1 ($F[1,4] = 0.1759$; $p > 0.05$; Figura 23B) e a razão SD1/SD2 ($F[1,4] = 0.089.513$; $p > 0.05$; Figura 23F) não tenham diferido estatisticamente sobre os animais acordados, o índice SD2 ($F[3,12] = 4.238$; $p < 0.05$; Figura 23D) demonstrou significativa diferença, sugerindo mudanças na atividade do balanço vagal global da VFC. A análise post hoc entre os períodos registrados nos animais em estado acordado, mostrou diferença significativa no período de 24 horas em SD2 ($p < 0.05$; Figura 23D) no grupo TCE, quando comparado ao registro basal realizado.

A análise dos parâmetros da VFC no domínio da frequência ilustradas nos gráficos da Figura 24, demonstraram que houve interação diferente em todas as componentes mensuradas sobre os animais em estado anestesiado tal como LFnu ($F[3,12] = 18.83$; $p < 0.01$; Figura 24A), HFnu ($F[3,12] = 18.80$; $p < 0.01$; Figura 24C) e a razão absoluta entre LF/HF ($F[3,12] = 17.18$; $p < 0.01$; Figura 24E). Em animais anestesiados, a análise post hoc entre os períodos registrados revelaram diferença significativa em ambas as componentes LFnu e HFnu após 24 ($p < 0.01$), 48 ($p < 0.01$) e 72 ($p < 0.05$) horas, ao mesmo tempo que a razão absoluta LF/HF foi significativa em 24 ($p < 0.05$), 48 ($p < 0.01$) e 72 ($p < 0.05$) horas, ambos avaliadas após TCE. Além disso, a componente LFnu também foi significativa sobre grupo controle no período de 24 horas ($p < 0.05$). Nos animais em estados acordado, nossos dados foram modulados em todas as componentes mensuradas no domínio da frequência, LFnu ($F[3,12] = 7.096$; $p < 0.01$; Figura 24B), HFnu ($F[3,12] = 6.978$; $p < 0.01$; Figura 24D) e a razão absoluta LF/HF ($F[3,12] = 8.123$; $p < 0.01$; Figura 24F), respectivamente.

Figura 24 - O efeito do procedimento cirúrgico e TCE sobre os parâmetros lineares da VFC no domínio da frequência sobre os animais em estado (A, C e E) anestesiado e (B, D e F) acordado.



(A-B) LFnu, componente de baixa frequência em unidade normalizada; (C-D) HFnu, componente de alta frequência em unidade normalizada; (E-F) LF/HF, razão absoluta entre LF e HF. As análises de dados foram conduzidas usando ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Sidak múltiplo teste comparando os grupos foi aplicado quando apropriado. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (n=5 por grupo). *p<0.05 comparado com o basal (grupo TCE), **p<0.01 comparado com basal (grupo TCE), #p<0.05 comparado com o basal (grupo controle) e &p<0.01 comparado com 48h e 72h (grupo TCE).

Fonte: Produção do próprio Autor (2020).

A análise entre os períodos registrados, demonstraram que nas primeiras 24 horas após TCE, os animais em estado acordado resultaram em alta atividade do tônus simpático (indexado por LFnu, $p < 0.01$) e do balanço simpático-vagal (indexado por LF/HF, $p < 0.01$) e menor atividade do tônus parassimpático (indexado por HFnu, $p < 0.01$), quando comparado com os registros basais.

Diferentemente do grupo do TCE, os animais do grupo controle não apresentaram resultados estatisticamente significantes sobre nenhum parâmetro do domínio da frequência, bem como em nenhum período registrado em estado acordado ($p > 0.05$), da qual é possível pressupor baixa atividade da VFC em comparação com o grupo TCE. Cabe salientar que após o período de 24 e 48 horas pós-TCE, todos os índices medidos associados ao domínio da frequência retornaram para os seus valores basais inicialmente ($p > 0.05$). Outro fator importante a ser ressaltando, foi uma evidente estabilização nos registros realizados sobre o grupo controle no estado acordado, da qual não foi manifestado nos animais sob administração de anestesia (Figura 24), indicando possível influencia anestésica sobre os animais.

5 DISCUSSÃO

Neste presente estudo, objetivamos desenvolver uma nova abordagem não invasiva para o registro do ECG em ratos no estado acordado, com a finalidade de avaliar os principais parâmetros lineares e não lineares da VFC tanto no estado basal quanto após TCE de moderada severidade. Os resultados deste estudo revelaram que o TCE moderado induzido por modelo de LPF em ratos acordados e anestesiados, acarreta disfunção da função autônoma cardiovascular. Adicionalmente, os achados também demonstraram que o método de registro do ECG em ratos realizado com administração do anestésico isoflurano, altera a análise dos parâmetros da VFC no presente modelo de TCE, devido ao fato de alterar as atividades do tônus simpático e parassimpático do SNA.

Neste contexto, é amplamente difundido na literatura que o TCE compreenda uma variedade de danos neurofisiológicos em indivíduos acometidos, inclusive sobre a função autônoma cardiovascular. Independente das rotas postuladas aos danos finais deste processo, este advém normalmente de prejuízos na regulação central do eixo hipotálamo-hipófise (ROYES; GOMEZ-PINILLA, 2019). Este processo implica mudanças diretas sobre o SNA, como imediato aumento nas atividades do tônus simpático e da frequência cardíaca geral, com diminuição gradual da VFC global mediada pela função vagal. Estas alterações da função cardiovascular após TCE, tem sido correlacionado em vários estudos como fator risco para o aumento da mortalidade (ERIC NYAM *et al.*, 2019; ZYGUN *et al.*, 2005). Neste sentido, a VFC surge como uma importante ferramenta para a clínica, uma vez que possibilita identificar a gravidade do TCE em complemento à clássica Escala de Coma de Glasgow já estabelecida. A análise da VFC no domínio do tempo permite examinar o comportamento global da função autônoma simpática e parassimpática. Embora a análise da VFC no domínio da frequência também permita a avaliação global do SNA, esta análise possibilita também explorar os ramos simpático e parassimpático do SNA de forma separada (SU *et al.*, 2005). O desequilíbrio do SNA refletido nos parâmetros da VFC tem sido ligado a diversos indicadores de distúrbios autônomos cardiovasculares. Por exemplo, baixa atividade da VFC global tem sido associada a um estado de ansiedade, a qual pode ser gerada em uma condição de estresse ou sob administração de algum tipo de anestésico (CARNEVALI; SGOIFO, 2014).

Embora o anestésico isoflurano seja amplamente utilizado no monitoramento fisiológico em modelos experimentais com ratos, existia a hipótese neste estudo de que este poderia desencadear efeitos adversos sobre o sistema cardiovascular basal do animal. Confirmando esta hipótese, os resultados evidenciaram alterações nos parâmetros da VFC no domínio do tempo e da frequência para os animais em estado anestesiado com isoflurano e acordado (Tabela 2). Analisando as medidas que refletem a VFC global (indexado por frequência cardíaca e SD2), os resultados indicaram baixa atividade durante manutenção da anestesia quando comparado aos animais em estado acordado. Em pesquisas realizadas anteriormente em ratos e camundongos, foi encontrado efeito similar no parâmetro de frequência, quando comparado aos animais em estado acordado ou com outros tipos de anestésicos (PACHON *et al.*, 2015; STEIN *et al.*, 2007). Em estudo pré-clínico, também foi identificado baixa média NN em comparação com grupo controle, corroborando com estes resultados (KATO *et al.*, 1992).

Em medida da atividade parassimpática linear (indexado por HF), os dados refletiram um aumento significativo no estado anestesiado (por isoflurano) em comparação com os animais no estado acordado, da qual sugere forte atividade sobre o tônus vagal. Reforçando este achado, foi visualizado na estimação do espectro de potência um pico significativo da componente HF em estado anestesiado, o que não é visto nos animais em estado acordado. Juntos, esses resultados suportam a ideia de que o animal anestesiado se encontrava em estado de estresse, mesmo em condição anestesiada. Importaneamente, estudos anteriores sugerem que baixos níveis de atividade parassimpática (indexado por HF), possam representar um quadro forte de estado de ansiedade. Baseado neste contexto, a medida HF pode refletir um relevante parâmetro para interesse no prognóstico clínico (CARNEVALI; SGOIFO, 2014).

Em contrapartida, estudos pré-clínicos e experimentais realizados anteriormente demonstraram a componente HF reduzida durante a administração de isoflurano (KATO *et al.*, 2016). Tal discrepância entre os achados pode ser explicada pelos diferentes métodos de registro de ECG aplicado, bem como pela concentração de isoflurano empregada no estudo realizado. Em apoio a esta última hipótese, Redfords *et al.* (2014) reportam que quanto maior a concentração de isoflurano, mais baixa atividade ocorrerá na VFC global. Embora exista divergência de estudos sobre

a adequada concentração de isoflurano a ser empregada para a avaliação da fisiologia cardiovascular em ratos. Um número crescente de pesquisas indica que este mecanismo pode promover como resultado final o deterioramento do sistema cardiovascular (REDFORS; SHAO; OMEROVIC, 2014; RÍHA *et al.*, 2012).

Na avaliação das atividades simpáticas (indexado por LF) e simpático-vagal (indexado pelas razões absolutas LF/HF e SD1/SD2) realizadas sob administração de anestesia, os resultados indicaram atividade sobre a razão absoluta SD1/SD2. Corroborando com estes resultados, estudos experimentais realizados anteriormente em ratos e cachorros revelaram que ambas as componentes HF e a razão absoluta LF/HF respondem para mudanças na concentração de isoflurano (KATO *et al.*, 2016; KAWASE *et al.*, 2002). A ligação de ambos os estudos sugere a tese de que embora a VFC seja predominantemente modulada pelo tônus simpático, neste estudo foi influenciado fortemente pela atividade parassimpática durante a administração de anestesia. Embora ainda não seja compreendido exatamente o mecanismo, a literatura especula que o aumento significativo da componente LF/HF possa colaborar com a concepção de um quadro de estado depressivo e estressante em ratos (WOOD *et al.*, 2012). Adicionalmente, é importante ressaltar que a maioria dos parâmetros medidos da VFC em estado anestesiado por isoflurano, desencadearam elevada variabilidade experimental da frequência cardíaca quando comparados aos animais em estado acordado, implicando por sua vez tanto na confiabilidade dos dados mensurados quanto na aplicação da análise da VFC.

Dentro deste contexto, buscou-se nos últimos anos diversos métodos de abordagens para o registro do ECG em ratos, em que fosse possível tanto mimetizar a fisiologia cardiovascular quanto minimizar o efeito da administração da anestesia. Deste modo, é possível destacar atualmente ambas as técnicas de contenção (MONGUE-DIN *et al.*, 2007) e telemetria (FENSKE *et al.*, 2016) como sendo as mais amplamente empregadas em modelos experimentais utilizando ratos. Todavia, estas ainda possuem numerosas limitações que por vezes, podem ainda comprometer a avaliação da VFC. Por exemplo, ainda que a técnica de contenção ocorra no estado consciente do animal (sem administração de anestesia ou procedimento cirúrgico), seja de fácil implementação e baixo custo, esta abordagem eventualmente pode estimular um quadro de estresse, uma vez que é realizado a imobilização do animal dentro de um tubo para medição do ECG (MONGUE-DIN *et al.*, 2007; OSBORNE,

1973). Similarmente, a técnica de registro de ECG em ratos por telemetria é atribuída como o método mais eficiente e promissor para registro fisiológico *in vivo*, visto que este além de permitir o registro em estado acordado e por um longo tempo, possibilita obter dados muito similares aos encontrados na fisiologia natural dos animais e com maior confiabilidade. No entanto, este sistema ainda requer o uso de procedimento cirúrgico, energia externa para operação dos circuitos, demandando tamanho físico limitado e um alto custo para implantação. Ademais, a telemetria não é passível de aplicação em animais muito enfermos, dado que os animais poderiam não sobreviver a cirurgia necessária para implantação do transmissor, o que impossibilitaria sua utilização em modelos fisiológicos com animais debilitados (ACCARDI *et al.*, 2016; NIEMEYER, 2016).

A partir destes relatos expostos acima, admitimos a importância para a idealização de um novo sistema de registro do ECG não invasivo em ratos, capaz de minimizar as diversas limitações apresentadas pelas abordagens empregadas atualmente, que por sua vez, prejudica na obtenção do melhor resultado translacional do que ocorre efetivamente na clínica. Com base neste panorama, elaborados no presente estudo um novo sistema de registro de ECG em ratos no estado acordado que superasse as principais barreiras encontradas, tais como contenção do animal, procedimento cirúrgico e administração de anestesia.

A nova abordagem experimental desenvolvida para o registro do ECG em ratos foi experimentada nos animais em estado acordado e comparada com os animais em estado anestesiado por administração de isoflurano, de modo a avaliar a função autonômica cardiovascular após TCE de moderada gravidade. Os achados obtidos no presente trabalho, revelaram que os parâmetros que refletem a VFC global (indexado por SD2) tiveram um declínio significativo, enquanto que a frequência cardíaca aumentou, ambos evidenciados 24 horas pós-TCE em comparação com as medidas basais, realizados em estado acordado. Estes resultados fortalecem a ideia de que os animais eventualmente podem ter sofrido estresse após o TCE. Similarmente, estudos tem reportado aumento da frequência cardíaca em indivíduos que sofreram TCE leve e grave (BAGULEY *et al.*, 2006; PATTONERI *et al.*, 2005; SENTHINATHAN *et al.*, 2017). A combinação de ambos estudos, confirma a hipótese postulada anteriormente, em que conforme a frequência cardíaca aumenta, os parâmetros que refletem a VFC global diminuem concomitantemente, após TCE.

Ainda neste contexto, estudos epidemiológicos têm demonstrado que a baixa atividade global da VFC, está associada a altas taxa de morbidade e mortalidade (LIAO *et al.*, 2002; THAYER; YAMAMOTO; BROSSCHOT, 2010).

Embora o presente estudo não tenha demonstrado valores estatisticamente significantes, sobre nenhum parâmetro de VFC global em animais sob estado anestesiado por isoflurano após TCE moderado, Umemoto e Chitravanshi (2017) mostraram em seu estudo, baixa frequência cardíaca após TCE de todos os graus (leve, moderado e grave) em ratos, utilizando administração de isoflurano. Além disso, identificamos que os autores se utilizaram de procedimento cirúrgico no protocolo experimental para mensuração da frequência cardíaca. Assim como nos registros basais realizados neste trabalho, esses resultados também corroboram com nossos achados, manifestando baixa frequência cardíaca quando utilizado a administração de isoflurano. Juntos, estes efeitos indicam claramente a interferência tanto do anestésico quanto do método de registro do ECG utilizados sobre os animais.

Em relação as atividades do tônus parassimpático (indexado por HFnu e RMSSD) após TCE, observamos baixos níveis de modulação nas primeiras 24 horas sobre os animais em estado acordado, ainda que o parâmetro RMSSD não tenha sido estatisticamente significante entre os períodos. Resultados semelhantes foram obtidos de diferentes graus de TCE em estudos clínicos anteriores, os quais mostraram forte redução da componente HF quando comparado a pacientes saudáveis (HENDÉN *et al.*, 2014; HILZ *et al.*, 2016; SENTHINATHAN *et al.*, 2017). Esses resultados reforçam os dados postulados na literatura, de que a função autonômica cardiovascular seja predominantemente modulada por atividade do tônus simpático após lesão cerebral. De outro ponto de vista, foi possível observar que o imediato aumento da frequência cardíaca após TCE, reduziu a atividade mediada pelo tônus parassimpático, de acordo como reportado na literatura. Já no estado anestesiado, o comportamento da atividade parassimpática se mostrou baixo sobre todos os parâmetros parassimpáticos lineares (indexado por RMSSD e HF) e não lineares (indexado por SD1) da VFC após o período de 24 horas pós-TCE. Por outro lado, todos os parâmetros mensurados no estado anestesiado, não retornaram para os valores basais com os animais em estado acordado, sugerindo forte influência anestésica. Na presente dissertação, pudemos notar também que as medidas realizadas sobre a administração por isoflurano, desencadearam valores muito

próximo entre o grupo controle e o TCE em alguns parâmetros medidos, ocasionando maior variabilidade experimental das métricas quando comparados aos animais em estado acordado.

Em um estudo avaliando todos os graus de TCE Su *et al.* (2005) postulou que em pacientes com níveis de 4 a 15 na Escala de Coma de Glasgow indicaram prevalência de aumento de atividade simpática (indexado por LF) e simpático-vagal (indexado por LF/HF). A literatura tem reportado que essa rápida hiperatividade simpática após TCE, também aumenta a pressão sanguínea para permitir a readaptação do sistema fisiológico, dado que a hipotensão (baixa pressão sanguínea) pode ser um fator de risco para mortalidade (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2017). Consolidando com os dados encontrados na literatura, nossos resultados revelaram um aumento nas atividades simpáticas (indexado por LF) e do balanço simpático-vagal (indexado por LF/HF e SD1/SD2), nas primeiras 24 horas pós-TCE na condição acordada, embora SD1/SD2 não tenha sido estatisticamente significativa. Além disso, nos animais em estado acordado, todos os valores retornaram para o estado basal subsequentemente em 48 e 72 horas após TCE. Ao contrário dos animais acordados, os parâmetros LF e as razões LF/HF e SD1/SD2 foram estatisticamente significantes em todos os períodos registrados em animais anestesiados após TCE. Entretanto, observamos que nenhum parâmetro retornou aos valores basais, como evidenciado no estado acordado. Adicionalmente, os parâmetros medidos em animais anestesiados com TCE mostraram comportamento similar aos do grupo controle.

Por fim, este trabalho descreveu o desenvolvimento de um sistema de registro de ECG (*hardware* e jaqueta de aquisição) voltado para ratos, bem como a reprodução de uma metodologia para sua correta aplicação. O sistema completo foi integrado em uma única placa de circuito impresso, possuindo dimensões bem reduzidas. É importante enfatizar também que o sistema conseguiu alcançar várias características importantes, requeridas para um sistema básico de aquisição do sinal do ECG, tais como dois eletrodos, mais um associado ao circuito da perna direita, taxa de amostragem fixada em 500 Hz, ganho ajustável em até 10x, resolução dos dados em 12 bit e interface de comunicação USB. Apesar de um número pequeno de animais utilizado neste estudo, nosso sistema permitiu avaliar os parâmetros da VFC após TCE em concordância com o encontrado em estudos clínicos. Segundo Nazeran, (2006) para um adequado processamento do sinal de ECG, um sistema deve requerer

uma digitalização com taxa de amostragem típica ou superior a 500 Hz, com no mínimo 12 bit de resolução no processo de conversão de analógico para digital. Portanto, analisando o sistema de registro do ECG aqui elaborado, foi possível mostrar que o mesmo cumpriu o objetivo traçado inicialmente tanto para a construção do sistema e sua abordagem, quanto para a avaliação da função autonômica cardiovascular pós-TCE em ratos.

Neste sentido, nosso estudo é considerado pioneiro na avaliação dos parâmetros lineares e não lineares da VFC em modelos animais de TCE por LPF aplicado em ratos. Adicionalmente, este sistema pode ser explorado em outros modelos fisiológicos, assim como em outros tipos de animais de pequeno porte (camundongo e entre outros).

6 CONCLUSÃO

Em resumo, os resultados apresentados neste estudo a respeito das atividades simpáticas e parassimpáticas evidenciados por meio dos índices da VFC, demonstram que o TCE moderado induzido em ratos, promove a disfunção do sistema nervoso autônomo. Adicionalmente, este estudo forneceu evidências claras de que a administração de anestesia por isoflurano pode acarretar efeitos sobre as métricas da VFC, comprometendo por sua vez, uma melhor abordagem translacional. Portanto, conclui-se que a nova abordagem de registro do ECG não invasivo capaz de ser aplicada à animais em estado acordado, demonstra ser uma solução de baixo custo e promissora para o avanço na compreensão da patofisiologia pós-TCE, como ocorre efetivamente na clínica.

Um ponto importante a ser considerado no presente estudo, é que além de analisar os parâmetros lineares e não lineares da VFC pós-TCE em ratos pela primeira vez, este novo modelo de registro de ECG em ratos foi idealizado sem o uso de anestesia, procedimento cirúrgico, contenção, bem como qualquer tipo de força exercida sobre o animal. Por esta razão, acreditamos que este modelo pode ser potencialmente aplicado a outros modelos experimentais fisiológicos que envolvam o registro e análise do ECG, bem como em outros tipos de roedores.

7 TRABALHOS FUTUROS

Tenda em vista os objetivos alcançados neste trabalho, sugere-se algumas mudanças no sistema desenvolvido, bem como na metodologia para trabalhos a serem realizados futuramente:

- Redução do tamanho da placa de circuito impresso a fim de tornar o sistema de registro de ECG portátil e menos obstrutivo.
- Integração do sistema de registro do ECG com a jaqueta de aquisição, de modo a transformar as partes em um único sistema.
- Desenvolvimento de uma nova fonte de alimentação, de modo a otimizar ainda mais o consumo de energia da bateria.
- Implementação de protocolo de comunicação sem fio (*bluetooth* ou *wireless*), para recepção dos dados fora do ambiente de aquisição de registros dos animais.
- Avaliação de demais parâmetros lineares e não lineares da VFC não incluídos neste estudo (e.g., SDS, NN50, pNN50, ApEn, SampEn, TINN, DFA α 1, DFA α 2, D₂, Índice Triangular, VLF e Potência Total).
- Inclusão de outras técnicas de manejo com os animais no protocolo experimental elaborado, para redução do tempo de adaptação dos animais ao sistema de registro do ECG.
- Validação da metodologia desenvolvida neste estudo, aplicadas a outros modelos experimentais, tais como detecção de crises epilépticas e lesão medular.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAJI, J. P. et al. Persisting effects of concussion on heart rate variability during physical exertion. **Journal of Neurotrauma**, v. 33, n. 9, p. 811–817, 2016.

ACCARDI, M. V et al. Rat cardiovascular telemetry: Marginal distribution applied to positive control drugs. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 81, p. 120–127, 2016.

ALMEIDA, C. E. R. et al. Traumatic brain injury epidemiology in Brazil. **World Neurosurgery**, v. 87, p. 540–547, 2016.

ALVARES, G. A. et al. Autonomic nervous system dysfunction in psychiatric disorders and the impact of psychotropic medications: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 41, n. 2, p. 89–104, 2016.

ANTHONY, D. C.; PITOSSO, F. J. Special issue commentary: the changing face of inflammation in the brain. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 53, p. 1–5, 2013.

ARDUINO. **Arduino Nano v.3**. Disponível em: <<https://store.arduino.cc/usa/arduino-nano>>. Acesso em: 11 jan. 2020.

AUBERT, E. et al. The analysis of heart rate variability in unrestrained rats. Validation of method and results. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 60, n. 3, p. 197–213, 1999.

BAGULEY, I. A. N. J. et al. The incidence of dysautonomia and its relationship with autonomic arousal following traumatic brain injury. **Brain Injury**, v. 21, n. 11, p. 1175–1181, 2007.

BAGULEY, I. J. et al. Dysautonomia and heart rate variability following severe traumatic brain injury. **Brain Injury**, v. 20, n. 4, p. 437–444, 2006.

BARKER-COLLO, S. L.; WILDE, N. J.; FEIGIN, V. L. Trends in head injury incidence in New Zealand: a hospital-based study from 1997/1998 to 2003/2004. **Neuroepidemiology**, v. 32, n. 1, p. 32–39, 2009.

BISHOP, S. et al. Parasympathetic baroreflexes and heart rate variability during acute stage of sport concussion recovery. **Brain Injury**, v. 31, n. 2, p. 247–259, 2017.

CAPONE-NETO, A.; RIZOLI, S. B. Linking the chain of survival: trauma as a traditional role model for multisystem trauma and brain injury. **Current Opinion in Critical Care**, v. 15, n. 4, p. 290–294, 2009.

CARNEVALI, L.; SGOIFO, A. Vagal modulation of resting heart rate in rats: the role of stress, psychosocial factors, and physical exercise. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 118, 2014.

CERNAK, I. et al. Pathophysiological response to experimental diffuse brain trauma differs as a function of developmental age. **Developmental Neuroscience**, v. 32, n. 5–6, p. 442–453, 2010.

CHRISTOFOLETTI, D. C. et al. Eletrocardiografia: um método útil na seleção de animais de experimentação. **Saúde em Revista**, v. 13, n. 33, p. 39–46, 2013.

CONDER, R. L.; CONDER, A. A. Heart rate variability interventions for concussion and rehabilitation. **Frontiers in Psychology**, v. 5, p. 890, 2014.

DECUYPERE, M.; JR, P. K. Spectrum of traumatic brain injury from mild to severe. **Surgical Clinics of North America**, v. 92, n. 4, p. 939–957, 2012.

DEWAN, M. C. et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. **Journal of Neurosurgery**, p. 1–18, 2018.

ERIC NYAM, T. T. et al. Traumatic brain injury increases the risk of major adverse cardiovascular and cerebrovascular events: a 13-year, population-based study. **World Neurosurgery**, v. 122, p. e740–e753, 2019.

FARRAJ, A. K.; HAZARI, M. S.; CASCIO, W. E. The utility of the small rodent electrocardiogram in toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 121, n. 1, p. 11–30, 2011.

FENSKE, S. et al. Comprehensive multilevel in vivo and in vitro analysis of heart rate fluctuations in mice by ECG telemetry and electrophysiology. **Nature Protocols**, v. 11, n. 1, p. 61–86, 2016.

FERNANDES, R. N. R.; SILVA, M. Epidemiology of traumatic brain injury in Brazil. **Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia**, v. 32, n. 3, p. 136–142, 2013.

FIORIN, F. S. et al. The impact of previous physical training on redox signaling after traumatic brain injury in rats: a behavioral and neurochemical approach. **Journal of Neurotrauma**, v. 33, n. 14, p. 1317–1330, 2016.

FIORIN, F. S. et al. Implication of surgical procedure in the induction of headache and generalized painful sensation in a fluid percussion injury model in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 307, p. 23–30, 2018.

FLOYD, C. L. et al. Craniectomy position affects morris water maze performance and hippocampal cell loss after parasagittal fluid percussion. **Journal of Neurotrauma**, v. 19, n. 3, p. 303–316, 2002.

FREY, L. C. Epidemiology of posttraumatic Epilepsy: a critical review. **Epilepsia**, v. 44, n. s10, p. 11–17, 2003.

GENNARELLI, T. A.; GRAHAM, D. I. Neuro pathology. In: **Textbook of traumatic brain injury**. Washington, D.C: American Psychiatric Publishing, Inc., 2005.

GREGORY, T.; SMITH, M. Cardiovascular complications of brain injury. **Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain**, v. 12, n. 2, p. 67–71, 2012.

GRIESBACH, G. S. et al. Temperature and heart rate responses to exercise following mild traumatic brain injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 30, n. 4, p. 281–291, 2013.

GUDMUNDSSON, S.; RUNARSSON, T. P.; SIGURDSSON, S. Test-retest reliability and feature selection in physiological time series classification. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 105, p. 50–60, 2012.

HASEN, M.; ALMOJUELA, A.; ZEILER, F. A. Autonomic dysfunction and associations with functional and neurophysiologic outcome in moderate/severe traumatic brain injury: a scoping review. **Journal of Neurotrauma**, v. 36, n. 10, p. 1–56, 2019.

HAYES, R. L. et al. A new model of concussive brain injury in the cat produced by extradural fluid volume loading: II. Physiological and neuropathological observations. **Brain Injury**, v. 1, n. 1, p. 93–112, 1987.

HEMMINGS, H.; EGAN, T. **Pharmacology and physiology for anesthesia: foundations and clinical application**. 2nd. ed. Elsevier, 2018.

HENDÉN, P. L. et al. Can baroreflex sensitivity and heart rate variability predict late neurological outcome in patients with traumatic brain injury. **Journal of Neurosurgical Anesthesiology**, v. 26, n. 1, p. 50–59, 2014.

HENDRICKS, H. T.; HEEREN, A. H.; VOS, P. E. Dysautonomia after severe traumatic brain injury. **European Journal of Neurology**, v. 17, n. 9, p. 1172–1177, 2010.

HILDEBRANDT, I. J.; SU, H.; WEBER, W. A. Anesthesia and other considerations for in vivo imaging of small animals. **Institute for Laboratory Animal Research Journal**, v. 49, n. 1, p. 17–26, 2008.

HILZ, M. J. et al. Frequency analysis unveils cardiac autonomic dysfunction after mild traumatic brain injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 28, n. 9, p. 1727–1738, 2011.

HILZ, M. J. et al. Eyeball pressure stimulation unveils subtle autonomic cardiovascular dysfunction in persons with a history of mild traumatic brain injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 32, n. 22, p. 1796–1804, 2015.

HILZ, M. J. et al. Valsalva maneuver unveils central baroreflex dysfunction with altered blood pressure control in persons with a history of mild traumatic brain injury. **BMC Neurology**, v. 16, p. 61, 2016.

HUFFMAN, J. C. et al. Patients with neurologic conditions I. Seizure disorders (including nonepileptic seizures), cerebrovascular disease, and traumatic brain injury. In: **Massachusetts general hospital handbook of general hospital psychiatry**. 6. ed. Philadelphia: Saunders, 2010. p. 237–253.

JAMALI, H. K.; WAQAR, F.; GERSON, M. C. Cardiac autonomic innervation. **Journal of Nuclear Cardiology**, v. 24, n. 5, p. 1558–1570, 2016.

JARRIN, D. C. et al. Short-term heart rate variability in a population-based sample of 10-year-old children. **Pediatric Cardiology**, v. 36, n. 1, p. 41–48, 2015.

JORDAN, B. D. The clinical spectrum of sport-related traumatic brain injury. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 4, p. 222–230, 2013.

KAMAL, V. K.; AGRAWAL, D.; PANDEY, R. M. Epidemiology, clinical characteristics and outcomes of traumatic brain injury: Evidences from integrated level 1 trauma center in India. **Journal of Neurosciences in Rural Practice**, v. 7, n. 4, p. 515–525, 2016.

KATO, K. et al. Different sensitivity to the suppressive effects of isoflurane anesthesia on cardiorespiratory function in SHR / Izm, WKY / Izm, and Crl: CD (SD) rats. **Experimental Animals**, v. 65, n. 4, p. 393–402, 2016.

KATO, M. et al. Spectral analysis of heart rate variability during isoflurane anesthesia. **Anesthesiology**, v. 77, n. 4, p. 669–674, 1992.

KAUR, P.; SHARMA, S. Recent advances in pathophysiology of traumatic brain injury. **Current Neuropharmacology**, v. 16, n. 8, p. 1224–1238, 2018.

KAWASE, M. et al. Heart rate variability and arterial blood pressure variability show different characteristic changes during hemorrhage in isoflurane-anesthetized, mechanically ventilated dogs. **Anesthesia & Analgesia**, v. 94, n. 1, p. 16–21, 2002.

KRAUS, J. F.; MCARTHUR, D. L. Epidemiology of head injury. In: COPPER, P. R.; GOLFINOS, J. F. (Eds.). **Head Injury**. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 2000. p. 1.

KRISHNAMOORTHY, V. et al. Association of early hemodynamic profile and the development of systolic dysfunction following traumatic brain injury. **Neurocritical Care**, v. 26, n. 3, p. 379–387, 2017.

KUFFLER, D. P. Maximizing neuroprotection: where do we stand? **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 8, p. 185–194, 2012.

LEES, T. et al. Heart rate variability as a biomarker for predicting stroke, post-stroke complications and functionality. **Biomarker Insights**, v. 13, p. 1–13, 2018.

LIAO, D. et al. Lower heart rate variability is associated with the development of coronary heart disease in individuals with diabetes: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. **Diabetes**, v. 51, n. 12, p. 3524–3531, 2002.

LUCAS, S. Headache management in concussion and mild traumatic brain injury. **Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 3, n. 10S2, p. S406-412, 2011.

MAAS, A. I. R. et al. Prognostic value of computerized tomography scan characteristics in traumatic brain injury: results from the IMPACT study. **Journal of Neurotrauma**, v. 24, n. 2, p. 303–314, 2007.

MAAS, A. I.; STOCCHETTI, N.; BULLOCK, R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. **The Lancet Neurology**, v. 7, n. 8, p. 728–741, 2008.

MAGALHÃES, A. L. G. et al. Epidemiology of traumatic brain injury in Brazil. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 53, n. 2, p. 15–22, 2017.

MAJDAN, M. et al. The impact of body mass index on severity, patterns and outcomes after traumatic brain injuries caused by low level falls. **European Journal of Trauma Emergency Surgery**, v. 41, n. 6, p. 651–656, 2015.

MARMAROU, A.; SHIMA, K. Comparative studies of edema produced by fluid percussion injury with lateral and central modes of injury in cats. **Advances in Neurology**, v. 52, p. 233–236, 1990.

MARSHALL, L. F. et al. A new classification of head injury based on computerized tomography. **Journal of Neurosurgery**, v. 75, n. supplement, p. S14–S29, 1991.

MARSHALL, L. F. Head injury: recent past, present, and future. **Neurosurgery**, v. 47, n. 3, p. 546–561, 2000.

MCCORRY, L. K. Physiology of the Autonomic Nervous System. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v. 71, n. 4, p. 78, 2007.

MCINTOSH, T. K. et al. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. **Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 233–244, 1989.

MENON, D. K. et al. Position statement: definition of traumatic brain injury. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 91, n. 11, p. 1637–1640, 2010.

MEYFROIDT, G.; BAGULEY, I. J.; MENON, D. K. Paroxysmal sympathetic hyperactivity: the storm after acute brain injury. **The Lancet Neurology**, v. 16, n. 9, p. 721–729, 2017.

MILLEN, J. E.; GLAUSER, F. L.; FAIRMAN, P. A comparison of physiological responses to percussive brain trauma in dogs and sheep. **Journal of Neurosurgery**, v. 62, n. 4, p. 587–591, 1985.

MONGUE-DIN, H. et al. Non-invasive restrained ECG recording in conscious small rodents: a new tool for cardiac electrical activity investigation. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 454, n. 1, p. 165–171, 2007.

MURAKAMI, M. et al. Inhalation anesthesia is preferable for recording rat cardiac function using an electrocardiogram. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 5, p. 834–839, 2014.

NAZERAN, H. Electrocardiography, computers in. In: WEBSTER, J. G. (Ed.). **Encyclopedia of medical devices and instrumentation**. 2. ed. New York, USA: Wiley, 2006. v.3, p. 34–52.

NIEMEYER, J. E. Telemetry for small animal physiology. **Laboratory Animals** (NY), v. 45, n. 7, p. 255–257, 2016.

NOLAN, S. Traumatic brain injury: a review. **Critical Care Nursing Quarterly**, v. 28, n. 2, p. 188–194, 2005.

NORTJE, J.; MENON, D. K. Traumatic brain injury: physiology, mechanisms, and outcome. **Current Opinion in Neurology**, v. 17, n. 6, p. 711–718, 2004.

OSBORNE, B. E. A restraining device facilitating electrocardiogram recording in rats. **Laboratory Animals**, v. 7, n. 2, p. 185–188, 1973.

PACHON, R. E. et al. Best anesthetics for assessing left ventricular systolic function by echocardiography in mice. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 308, n. 12, p. H1525–H1529, 2015.

PATTONERI, P. et al. Circadian blood pressure and heart rate changes in patients in a persistent vegetative state after traumatic brain injury. **The Journal of Clinical Hypertension (Greenwich)**, v. 7, n. 12, p. 734–739, 2005.

PIERCE, J. E. S. et al. Enduring cognitive, neurobehavioral and histopathological changes persist for up to one year following severe experimental brain injury in rats. **Neuroscience**, v. 87, n. 2, p. 359–369, 1998.

PRINS, M. et al. The pathophysiology of traumatic brain injury at a glance. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, n. 6, p. 1307–1315, 2013.

PUMPRLA, J. et al. Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. **International Journal of Cardiology**, v. 84, n. 1, p. 1–14, 2002.

PURKAYASTHA, S.; STOKES, M.; BELL, K. R. Autonomic nervous system dysfunction in mild traumatic brain injury: a review of related pathophysiology and symptoms. **Brain Injury**, v. 33, n. 9, p. 1129–1136, 2019.

RAPENNE, T. et al. Could heart rate variability predict outcome in patients with severe head injury? A pilot study. **Journal of Neurosurgical Anesthesiology**, v. 13, n. 3, p. 260–268, 2001.

REDFORS, B.; SHAO, Y.; OMEROVIC, E. Influence of anesthetic agent, depth of anesthesia and body temperature on cardiovascular functional parameters in the rat. **Laboratory Animals**, v. 48, n. 1, p. 6–14, 2014.

RÍHA, H. et al. Effects of isoflurane concentration on basic echocardiographic parameters of the left ventricle in rats. **Physiological Research**, v. 61, n. 4, p. 419–423, 2012.

ROBERTSON, D.; LOW, P.; PLINSKY, R. **Prime on the autonomic nervous system**. 3. ed. London: Academic Press, 2012.

ROWAN, W. H. 3RD et al. Heart rate variability in rodents: uses and caveats in toxicological studies. **Cardiovascular Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 28–51, 2007.

ROYES, L. F. F.; GOMEZ-PINILLA, F. Making sense of gut feelings in the traumatic brain injury pathogenesis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 102, p. 345–361, 2019.

RUFF, R. L.; RIECHERS, R. G. Effective Treatment of Traumatic Brain Injury. **Journal of the American Medical Association**, v. 308, n. 19, p. 2032–2033, 2012.

SAATMAN, K. E. et al. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. **Journal of Neurotrauma**, v. 25, n. 7, p. 719–738, 2008.

SCHUBERT, C. et al. Effects of stress on heart rate complexity - A comparison between short-term and chronic stress. **Biological Psychology**, v. 80, n. 3, p. 325–332, 2009.

SENTHINATHAN, A. et al. Heart rate variability of athletes across concussion recovery milestones: a preliminary study. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v. 27, n. 3, p. 288–295, 2017.

SHI, J. et al. Review: Traumatic brain injury and hyperglycemia, a potentially modifiable risk factor. **Oncotarget**, v. 7, n. 43, p. 71052–71061, 2016.

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

SOBOT, R. Implantable RF telemetry for cardiac monitoring in the murine heart: a tutorial review. **EURASIP Journal on Embedded Systems**, v. 1, p. 1–15, 2013.

STEIN, A. B. et al. Effects of anesthesia on echocardiographic assessment of left ventricular structure and function in rats. **Basic Research in Cardiology**, v. 102, n. 1, p. 28–41, 2007.

SU, C. et al. Sympathetic and parasympathetic activities evaluated by heart-rate variability in head injury of various severities *. **Clinical Neurophysiology**, v. 116, n. 6, p. 1273–1279, 2005.

SYKORA, M. et al. Autonomic impairment in severe traumatic brain injury: A multimodal neuromonitoring study. **Critical Care Medicine**, v. 44, n. 6, p. 1173–1181, 2016.

SZUTS, T. A. et al. A wireless multi-channel neural amplifier for freely moving animals. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 2, p. 263–270, 2011.

TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY; THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. **European Heart Journal**, v. 17, n. 3, p. 354–381, 1996.

TEASDALE, G.; JENNETT, B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. **The Lancet**, v. 2, n. 7872, p. 81–84, 1974.

THAYER, J. F.; YAMAMOTO, S. S.; BROSSCHOT, J. F. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. **International Journal of Cardiology**, v. 141, n. 2, p. 122–131, 2010.

THIBAUT, L. E. et al. Biomechanical aspects of a fluid percussion model of brain injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 9, n. 4, p. 311–322, 1992.

THOMPSON, H. J. et al. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. **Journal of Neurotrauma**, v. 22, n. 1, p. 42–75, 2005.

THOMPSON, J. W. G.; HAGEDORN, D. Multimodal Analysis: New Approaches to the Concussion Conundrum. **Journal of Clinical Sport Psychology**, v. 6, n. 1, p. 22–46, 2012.

TULPPO, M. P. et al. Quantitative beat-to-beat analysis of heart rate dynamics during exercise. **American Journal Physiology**, v. 271, n. 1 pt 2, p. H244–H252, 1996.

UMEMOTO, Y.; CHITRAVANSI, V. C. Cardiovascular changes in urethane anesthetized Wistar rats after the traumatic brain injury. **Research Reports**, v. 1, p. 1–22, 2017.

VAN-BAALEN, B. et al. Traumatic brain injury: classification of initial severity and determination of functional outcome. **Disability and Rehabilitation**, v. 25, n. 1, p. 9–18, 2003.

VAN RAVENSWAAIJ-ARTS, C. M. A. et al. Heart rate variability. **Annals of Internal Medicine**, v. 118, n. 6, p. 436–447, 1993.

VASSALLE, M.; ZHANG, H. On the mechanisms of cholinergic control of the sinoatrial node discharge. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 173–186, 2001.

VINIK, A. I. The conductor of the autonomic orchestra. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, p. 71, 2012.

WIJAYATILAKE, D. S.; SHERREN, P. B.; JIGAJINNI, S. V. Systemic complications of traumatic brain injury. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 28, n. 5, p. 525–531, 2015.

WOOD, S. K. et al. Depressive and cardiovascular disease comorbidity in a rat model of social stress: a putative role for corticotropin-releasing factor. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 222, n. 2, p. 325–336, 2012.

XIONG, Y.; MAHMOOD, A.; CHOPP, M. Animal models of traumatic brain injury. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 2, p. 128–142, 2013.

ZHENG, A.; MORITANI, T. Effect of the combination of ginseng, oriental bezoar and glycyrrhiza on autonomic nervous activity as evaluated by power spectral analysis of HRV and cardiac depolarization-repolarization process. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)**, v. 54, n. 2, p. 148–153, 2008.

ZIEBELL, J. M. et al. Experimental diffuse brain injury results in regional alteration of gross vascular morphology independent of neuropathology. **Brain Injury**, v. 30, n. 2, p. 217–224, 2016.

ZILA, I. et al. Heart rate variability and inflammatory response in rats with lipopolysaccharide-induced endotoxemia. **Physiological Research**, v. 64, n. Suppl 5, p. S669–S676, 2015.

ZYGUN, D. Non-neurological organ dysfunction in neurocritical care: impact on outcome and etiological considerations. **Current Opinion in Critical Care**, v. 11, n. 2, p. 139–143, 2005.

ZYGUN, D. A. et al. Non-neurologic organ dysfunction in severe traumatic brain injury*. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 3, p. 654–660, 2005.