



**Mariana de Almeida Noia Pereira**

Licenciatura em Ciências da Engenharia Biomédica

## **Análise da variabilidade da frequência cardíaca na resistência insulínica mediada pelo corpo carotídeo**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientadora: Carla Maria Quintão Pereira, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Coorientadora: Sílvia Margarida Vilares Santos Conde, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Dra. Célia Maria Reis Henriques

Arguente: Prof. Dr. Rui Manuel Fonseca Pinto

Vogal: Prof. Dra. Sílvia Margarida Vilares Santos Conde

**Novembro, 2019**



**Análise da variabilidade da frequência cardíaca na resistência insulínica mediada pelo corpo carotídeo**

Copyright © Mariana de Almeida Noia Pereira, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Carla Quintão, por me ter sempre acompanhado e encaminhado, pela partilha de saberes, pelo cuidado e dedicação e pela excelência que coloca em tudo o que faz. Quero agradecer, também, à minha coorientadora, Professora Sílvia Conde, por sempre me receber tão bem no laboratório, por apesar das mil e uma coisas, nunca deixar de ter tempo para mim, por todas as explicações e por todo o carinho.

Quero agradecer à Joana Sacramento e à Bernardete Melo, por todo o apoio e interesse, e pela paciência infundável. O vosso papel foi essencial e aprendi imenso convosco.

Um obrigada enorme aos amigos que a faculdade me deu, em especial à Sara, à Joana, ao Ricardo e ao Pedro, por estarem sempre ao meu lado e tornarem tudo melhor, ao longo destes cinco anos. À Sílvia e ao Pedro, por serem exemplo e inspiração.

Às amigas de longa data, Margarida, Sara e Tânia, por me ensinarem o que é a verdadeira amizade e pela oportunidade de crescermos juntas, lado a lado, em todos os momentos.

Por último, devo o maior obrigada à minha família. Obrigada a todos. Obrigada à minha avó e ao meu avô, aos meus tios e aos meus primos. Obrigada à minha mãe e ao meu irmão, Francisco, por todo o carinho e amor e por me apoiarem incondicionalmente em tudo.



## Resumo

---

A análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca tem vindo a ser cada vez mais utilizada enquanto ferramenta, ainda que indireta, de acesso à atividade e funcionamento do Sistema Nervoso Autónomo. Por outro lado, as doenças do foro metabólico têm vindo a aumentar consideravelmente a sua incidência, em todo o mundo.

Vários estudos têm surgido, defendendo que a patologia metabólica, como a Obesidade, o Síndrome Metabólico e a Diabetes tipo 2, implica alterações autonómicas, nomeadamente a hiper ativação da via simpática do Sistema Nervoso Autónomo. Neste sentido, sugere-se a existência de neuropatia autonómica associada a distúrbios metabólicos.

Estudos recentes sugerem que o bloqueio cirúrgico do Nervo do Seio Carotídeo, nervo sensitivo do Corpo Carotídeo, retrocede os sintomas associados à patologia metabólica, nomeadamente, a resistência à insulina e a intolerância à glicose.

Neste projeto, analisaram-se séries temporais de intervalos RR em modelos animais de ratos saudáveis, em ratos com patologia metabólica e em ratos sujeitos a bloqueio cirúrgico do Nervo do Seio Carotídeo. A resposta autonómica na patologia metabólica foi estudada em condição de repouso e de estímulo metabólico e não metabólico. A análise das séries temporais de intervalos RR representa a análise da variabilidade da frequência cardíaca.

Foram observadas alterações autonómicas resultantes de patologia metabólica. Observou-se que a patologia metabólica tem implicações ao nível da res-

posta do Sistema Nervoso Autônomo a uma condição de estímulo, quer seja metabólico ou não metabólico. Corroborou-se o previamente descrito, tendo-se notado que a denervação do Nervo do Seio Carotídeo aproxima a atividade autonómica de animais pré-diabéticos a animais saudáveis.

Deste modo, ainda que com uma amostra reduzida, os resultados sugerem que a denervação do Nervo do Seio Carotídeo poderá ser uma terapêutica inovadora na resistência à insulina, enquanto forma de retroceder os impactos na atividade autonómica desta patologia.

**Palavras-chave:** Sistema nervoso autónomo; Variabilidade da frequência cardíaca; Resistência à insulina; Diabetes tipo 2; Corpo carotídeo; Nervo do seio carotídeo

---

## Abstract

---

Heart Rate Variability analysis has been increasingly used as a tool, although an indirect one, to access to the activity of the Autonomic Nervous System. On the other hand, metabolic diseases have been increasing worldwide.

Several studies have emerged arguing that metabolic pathology, such as Obesity, Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes, implies autonomic changes, namely the hyper activation of the sympathetic pathway of the Autonomic Nervous System. That way, the existence of autonomic neuropathy associated with metabolic disorders is suggested.

Recent studies suggest that surgical blockade of the carotid sinus nerve, the sensory nerve of the carotid body, reverses the symptoms associated with metabolic pathology explicitly insulin resistance and glucose intolerance.

In this project, RR interval time series were analyzed in healthy rat animal models, in metabolic pathology rats and in rats subjected to surgical carotid sinus denervation. The autonomic response in metabolic pathology was studied in resting and stimulating metabolic and non-metabolic condition. The RR interval time series analysis represents the analysis of heart rate variability.

Autonomic changes resulting from metabolic pathology have been observed. It was observed that metabolic disorders have implications in the autonomic response to a stimulus condition, whether metabolic or non-metabolic. It was corroborated the statements previously described, the denervation of the Carotid Sinus Nerve approximates the autonomic activity of pre-diabetic animals to healthy animals.

Thus, although with a reduced sample, the results suggest that the denervation of the Carotid Sinus Nerve may be an innovative therapy for insulin resistance as a way of reversing the impacts on the autonomic activity of this pathology.

**Keywords:** Autonomic nervous system; Heart rate variability; Insulin resistance; Type 2 diabetes; Carotid body; Carotid Sinus Nerve

---

# Conteúdos

<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>xix</b>
<b>Siglas .....</b>	<b>xxi</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1. Contextualização .....	2
1.2. Objetivos específicos do projeto .....	4
<b>2. Revisão Bibliográfica e Enquadramento Teórico.....</b>	<b>7</b>
2.1. Sistema nervoso autónomo .....	7
2.2. Sistema cardiovascular .....	9
2.3. Relação entre o sistema nervoso autónomo e o sistema cardiovascular .....	12
2.3.1. Barorreflexo .....	14
2.4. Métodos de análise da VFC.....	14
2.4.1. Métodos lineares no domínio do tempo .....	14
2.4.2. Métodos lineares no domínio da frequência .....	17
2.4.3. Métodos não lineares .....	18
2.5. Corpo carotídeo .....	24
2.6. A patologia de resistência à insulina .....	26
<b>3. Estado da Arte .....</b>	<b>31</b>
<b>4. Materiais e Métodos.....</b>	<b>35</b>
4.1. Modelos animais e aquisição dos dados experimentais .....	36
4.1.1. Atividade cardíaca em modelos animais de ratos Wistar .....	42
4.1.2. Efeitos da anestesia Pentobarbital Sódico no rato Wistar.....	43
4.2. Processamento dos dados – Interface desenvolvida em MatLab para análise da VFC .....	44
4.2.1. Análise da VFC no domínio do tempo.....	45
4.2.2. Análise da VFC no domínio da frequência.....	57

4.3. Análise estatística dos resultados.....	64
<b>5. Análise e Discussão de Resultados .....</b>	<b>67</b>
5.1. Estudo da VFC no repouso: comparação entre os efeitos de diferentes dietas hipercalóricas no SNA.....	68
5.2. Estudo da VFC em situação de estímulo: comparação entre os efeitos de diferentes dietas hipercalóricas no SNA.....	80
5.2.1. A VFC no estímulo de Anoxia.....	81
5.2.2. A VFC no estímulo de Glicose.....	95
5.3. Estudo da VFC no repouso: animais sujeitos a bloqueio cirúrgico do NSC.....	102
5.4. Estudo detalhado da VFC no domínio da frequência.....	113
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>119</b>
6.1. Efeitos de diferentes dietas hipercalóricas no SNA.....	120
6.2. Efeitos de diferentes dietas hipercalóricas na resposta autonómica..	121
6.3. Efeitos da denervação do NSC na resistência insulínica .....	122
6.4. Trabalhos futuros.....	123
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>125</b>
<b>Anexo I: Composição Nutricional das Dietas .....</b>	<b>131</b>

# Lista de Figuras

FIGURA 1. – DIAGRAMA ILUSTRATIVO DO PAPEL, SOBRE OS VÁRIOS ÓRGÃOS, DAS DUAS VIAS DO SISTEMA NERVOSO AUTÓNOMO: SIMPÁTICA E PARASSIMPÁTICA. ....	9
FIGURA 2. – ILUSTRAÇÃO DA TRANSMISSÃO DO IMPULSO ELÉTRICO AO LONGO DAS CÉLULAS EXCITÁVEIS DO CORAÇÃO DOS MAMÍFEROS E REPRESENTAÇÃO DAS QUATRO CÂMARAS CARDÍACAS. ....	10
FIGURA 3. – REPRESENTAÇÃO DO SINAL ELÉTRICO ORIUNDO DA ATIVIDADE CARDÍACA: DOIS BATIMENTOS CARDÍACOS CONSECUTIVOS. ....	11
FIGURA 4. – REPRESENTAÇÃO DA VFC PARA UM RATO WISTAR SAUDÁVEL: TACOGRAMA DE FREQUÊNCIAS (INTERVALO TEMPORAL RR AO LONGO DE VÁRIOS BATIMENTOS CARDÍACOS). ....	12
FIGURA 5. – INERVAÇÃO SIMPÁTICA E PARASSIMPÁTICA (OU VAGAL) DO CORAÇÃO. ....	13
FIGURA 6. – HISTOGRAMA DE DENSIDADE DOS INTERVALOS RR E ILUSTRAÇÃO DA ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA (VFC), TENDO POR BASE O MÉTODO DO ÍNDICE TRIANGULAR DA VFC. ....	17
FIGURA 7. – REPRESENTAÇÃO DE UM GRÁFICO DE POINCARÉ, COM APRESENTAÇÃO DE EXEMPLOS DE VALORES DOS PARÂMETROS PARA ANÁLISE (SD1 E SD2). ....	19
FIGURA 8. – ILUSTRAÇÃO DAS DIFERENTES FORMAS DE DISPERSÕES CONSIDERADAS NA ANÁLISE DE GRÁFICOS DE POINCARÉ. ....	20
FIGURA 9. – REPRESENTAÇÃO VISUAL DOS PARÂMETROS GEOMÉTRICOS UTILIZADOS PARA ANÁLISE DO GRÁFICO DE POINCARÉ. ....	21
FIGURA 10. – REPRESENTAÇÃO DA ANÁLISE <i>DETRENDED FRACTAL SCALING EXPONENT</i> DE UM PERFIL DE DADOS RR COM APRESENTAÇÃO DE EXEMPLOS DE VALORES DOS PARÂMETROS DE ANÁLISE EM DUAS DIFERENTES ESCALAS. ....	22
FIGURA 11. – REPRESENTAÇÃO DA ANÁLISE PELO MÉTODO DO DECLIVE DA LEI DA POTÊNCIA DE UM PERFIL DE DADOS RR, COM APRESENTAÇÃO DE UM EXEMPLO DE VALOR PARA O PARÂMETRO DE ANÁLISE (O DECLIVE DA RETA OBTIDA). ....	23
FIGURA 12. – LOCALIZAÇÃO E ANATOMIA MICROSCÓPICA DO CC: EM (A) A LOCALIZAÇÃO DO CC E EM (B) A ANATOMIA DO CC. ....	24
FIGURA 13. – PRODUÇÃO E AÇÃO DA INSULINA, O PAPEL DESTA HORMONA A NÍVEL DO PÂNCREAS E DO FÍGADO. ....	26
FIGURA 14. – ESQUEMÁTICO DOS ÓRGÃOS EFETORES DO SNS, SENDO A ESTIMULAÇÃO DO SNS ORIGINADA PELA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES DO CC. ....	32
FIGURA 15. – SECÇÃO DOS NERVOS DO SEIO CAROTÍDEO. REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DO LOCAL DE RESSECÇÃO DO NSC. ....	37
FIGURA 16. – ESQUEMÁTICO DA AQUISIÇÃO E ANÁLISE DE DADOS, COM REFERÊNCIA À ESTRUTURA ANATÓMICA E LOCALIZAÇÃO DO CC. ....	39
FIGURA 17. – CRONOGRAMA DA ANÁLISE DE SEGMENTOS TEMPORAIS DE SÉRIES DE INTERVALOS RR PARA ESTUDO DO IMPACTO DE UMA CONDIÇÃO DE ANOXIA. ....	41

FIGURA 18. – CRONOGRAMA DA ANÁLISE DE SEGMENTOS TEMPORAIS DE SÉRIES DE INTERVALOS RR PARA ESTUDO DO IMPACTO DE UM AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NO SANGUE.....	41
FIGURA 19. – GRÁFICO REPRESENTATIVO DAS CURVAS DE EXCURSÃO DE GLICOSE ADMINISTRADA POR VIA INTRAVENOSA (0,75 MG/KG) AO LONGO DO TEMPO (EM MINUTOS).....	42
FIGURA 20. – PÁGINA INICIAL DA INTERFACE DESENVOLVIDA EM MATLAB.....	45
FIGURA 21. – FLUXOGRAMA DAS FUNCIONALIDADES DO MÓDULO DA INTERFACE DESTINADO A ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NO DOMÍNIO DO TEMPO.....	46
FIGURA 22. – VISTA GERAL DO MÓDULO DA INTERFACE DESTINADO A UMA ANÁLISE DO SINAL DE RR NO DOMÍNIO DO TEMPO. ....	47
FIGURA 23. – SECÇÃO DA INTERFACE DESTINADA A APRESENTAÇÃO DO SINAL SOB A FORMA GRÁFICA E AO PROCESSAMENTO DO SINAL.....	48
FIGURA 24. – FLUXOGRAMA DAS FUNCIONALIDADES DE PROCESSAMENTO DO SINAL DISPONIBILIZADAS NA SECÇÃO <i>SIGNAL PRE-PROCESSING</i> DO MÓDULO DA INTERFACE. ....	49
FIGURA 25. – SECÇÃO DO MÓDULO DE ANÁLISE NO DOMÍNIO DO TEMPO DESTINADA A APRESENTAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESTUDO DA SÉRIE TEMPORAL DE INTERVALOS RR SELECIONADA.....	50
FIGURA 26. – SECÇÃO DO MÓDULO DE ANÁLISE NO DOMÍNIO DO TEMPO DESTINADA A APRESENTAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ORIGEM GEOMÉTRICA: TI E TINN. APRESENTAÇÃO DO HISTOGRAMA DA SÉRIE TEMPORAL DE INTERVALOS RR EM ANÁLISE. ....	51
FIGURA 27. – SECÇÃO DO MÓDULO DE ANÁLISE NO DOMÍNIO DO TEMPO DESTINADA A APRESENTAÇÃO DOS PARÂMETROS RESULTANTES DE UMA ANÁLISE NÃO LINEAR.....	52
FIGURA 28. – BOTÕES INTERATIVOS QUE PERMITEM O ACESSO DIRETO A QUALQUER UM DOS RESTANTES MÓDULOS DA INTERFACE.....	52
FIGURA 29. – VISTA GERAL DO MÓDULO DA INTERFACE DESTINADO A UMA ANÁLISE DOS GRÁFICOS DE POINCARÉ..	55
FIGURA 30. – SECÇÃO DO MÓDULO DESTINADA A APRESENTAÇÃO DO GRÁFICO DE POINCARÉ E AOS RESPECTIVOS VALORES DE SD1, SD2 E SD1/SD2.....	55
FIGURA 31. – SECÇÃO DESTINADA AOS INPUTS DO UTILIZADOR PARA CÁLCULO DOS PARÂMETROS <i>LMAX/WMAX</i> E <i>BOXCOUNT</i> . ....	56
FIGURA 32. – SECÇÃO DO MÓDULO <i>POINCARÉ PLOT ANALYSIS</i> QUE PERMITE AO UTILIZADOR VISUALIZAR O GRÁFICO DE POINCARÉ DO SINAL ANTES DO PRÉ-PROCESSAMENTO. ....	57
FIGURA 33. – ILUSTRAÇÃO DE UMA VISÃO GERAL DO MÓDULO DA INTERFACE DESTINADO A UMA ANÁLISE DA VFC NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA, COM RECURSO À APRESENTAÇÃO, COMO EXEMPLO, DE UMA SÉRIE DE INTERVALOS RR EM ANÁLISE. ....	57
FIGURA 34. – FLUXOGRAMA DAS FUNCIONALIDADES DO MÓDULO DA INTERFACE DESTINADO A ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA.....	58
FIGURA 35. – APRESENTAÇÃO DA SECÇÃO DESTINADA A REMOÇÃO DE ARTEFACTOS E INTERPOLAÇÃO DA SÉRIE ORIGINAL, COM APRESENTAÇÃO DE PARÂMETROS DE ANÁLISE NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA. ....	60
FIGURA 36. – RESULTADO OBTIDO APÓS CÁLCULO DAS DIFERENÇAS DA SÉRIE DE INTERVALOS RR, APÓS A REMOÇÃO DE POTENCIAIS ARTEFACTOS. ....	62
FIGURA 37. – RESULTADO OBTIDO APÓS CÁLCULO DAS DIFERENÇAS ENTRE OS INTERVALOS RR DA SÉRIE APÓS A INTERPOLAÇÃO. ....	63
FIGURA 38. – SECÇÃO DESTINADA AO CÁLCULO DAS DIFERENÇAS ENTRE INTERVALOS RR DA SÉRIE.....	63
FIGURA 39. – EFEITO DE DIETAS HIPERCALÓRICAS NO SISTEMA NERVOSO AUTÓNOMO (SNA), RESULTADO DE UMA ANÁLISE NO DOMÍNIO DO TEMPO: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS ÍNDICES UTILIZADOS PARA ANÁLISE DA VFC NOS VÁRIOS GRUPOS DE ANIMAIS EM ESTUDO.....	71

FIGURA 40. – EXEMPLOS DE REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE SÉRIES TEMPORAIS RR EM ESTUDO, PARA CADA GRUPO DE ANIMAIS.....	72
FIGURA 41. – EFEITO DE DIETAS HIPERCALÓRICAS NO SISTEMA NERVOSO AUTÓNOMO (SNA), RESULTADO DE UMA ANÁLISE NO DOMÍNIO DO TEMPO DOS PARÂMETROS DESCRITIVOS DAS DISTRIBUIÇÕES DE INTERVALOS RR, NOS VÁRIOS GRUPOS DE ANIMAIS EM ESTUDO. ....	73
FIGURA 42. – ÍNDICES GEOMÉTRICOS DE ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA (VFC).....	73
FIGURA 43. – EFEITO DE DIETAS HIPERCALÓRICAS NO SNA. ÍNDICES CALCULADOS NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA. ..	75
FIGURA 44. – ILUSTRAÇÃO DE EXEMPLOS DE GRÁFICOS DE POINCARÉ PARA OS VÁRIOS GRUPOS DE ANIMAIS EM ESTUDO. ....	76
FIGURA 45. – EFEITO DE DIETAS HIPERCALÓRICAS NO SNA POR ÍNDICES DE ANÁLISE DAS DISPERSÕES DE POINCARÉ. ....	77
FIGURA 46. – REPRESENTAÇÃO DA VARIAÇÃO DO PARÂMETRO <i>BOXCOUNT</i> , RESULTADO DE UMA ANÁLISE DO GRÁFICO DE POINCARÉ, NAS DIFERENTES DIETAS. ....	78
FIGURA 47. – COMPORTAMENTO DA MÉDIA DE INTERVALOS RR, EM MILISSEGUNDOS, NUM ANIMAL SAUDÁVEL E NUM ANIMAL COM PATOLOGIA METABÓLICA. ....	82
FIGURA 48. – EFEITO DE PATOLOGIA METABÓLICA NA RESPOSTA AUTONÓMICA A UMA CONDIÇÃO DE ANOXIA. ....	83
FIGURA 49. – EFEITO DE UMA CONDIÇÃO DE ANOXIA NO SNA, RESULTADO DE UMA ANÁLISE DOS PARÂMETROS DESCRITIVOS DAS DISTRIBUIÇÕES DE INTERVALOS RR. ....	84
FIGURA 50. – EFEITO DE UMA CONDIÇÃO DE ANOXIA NO SNA. ÍNDICES CALCULADOS NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA. ....	85
FIGURA 51. – EFEITO DE PATOLOGIA METABÓLICA NA RESPOSTA AUTONÓMICA A UMA ESTIMULAÇÃO REPETIDA COM ANOXIA. ....	87
FIGURA 52. – EFEITO DE UM SEGUNDO MOMENTO DE ANOXIA NO SNA DE RATOS COM E SEM PATOLOGIA METABÓLICA (HFHSu E CONTROLO, RESPETIVAMENTE).....	88
FIGURA 53. – EFEITO DE UMA CONDIÇÃO REPETIDA DE ANOXIA NO SNA. ÍNDICES CALCULADOS NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA. ....	89
FIGURA 54. – COMPORTAMENTO DOS ÍNDICES DE ANÁLISE DA VFC EM DOIS MOMENTOS DE ANOXIA CONSECUTIVOS (ANOXIA 1 E ANOXIA 2) PARA O RATO WISTAR CONTROLO. ....	91
FIGURA 55. – COMPORTAMENTO DOS ÍNDICES DE ANÁLISE DA VFC NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA, EM DOIS MOMENTOS DE ANOXIA CONSECUTIVOS (ANOXIA 1 E ANOXIA 2) PARA O RATO WISTAR CONTROLO.....	92
FIGURA 56. – COMPORTAMENTO DOS ÍNDICES DE ANÁLISE DA VFC EM DOIS MOMENTOS DE ANOXIA CONSECUTIVOS (ANOXIA 1 E ANOXIA 2) PARA UM RATO WISTAR SUJEITO A UMA DIETA HFHSu. ....	93
FIGURA 57. – COMPORTAMENTO DOS ÍNDICES DE ANÁLISE DA VFC NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA, EM DOIS MOMENTOS DE ANOXIA CONSECUTIVOS (ANOXIA 1 E ANOXIA 2) PARA UM RATO WISTAR COM PATOLOGIA METABÓLICA. ....	94
FIGURA 58. – COMPORTAMENTO DO VALOR DA MÉDIA RR (EM MILISSEGUNDOS) AO LONGO DO TEMPO, AQUANDO DO ESTÍMULO DE GLICOSE, PARA O GRUPO DE ANIMAIS SAUDÁVEIS (CONTROLO) E PARA O GRUPO DE ANIMAIS RESISTENTES À INSULINA (HFHSu). ....	96
FIGURA 59. – EFEITO DE UMA DIETA HIPERCALÓRICA NA RESPOSTA AO ESTÍMULO DE GLICOSE, RESULTADO DE UMA ANÁLISE DA VFC NO DOMÍNIO DO TEMPO. ....	97
FIGURA 60. – EFEITO DE UMA CONDIÇÃO DE AUMENTO DOS NÍVEIS DE GLICOSE NO SANGUE NA RESPOSTA DO SNA. ÍNDICES CALCULADOS NO DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA. ....	99
FIGURA 61. – EFEITO DO AUMENTO DOS NÍVEIS DE GLICOSE NO SANGUE NO SNA, PELOS ÍNDICES DE ANÁLISE DAS DISPERSÕES DE POINCARÉ. ....	100
FIGURA 62. – REPRESENTAÇÃO DA VARIAÇÃO DO PARÂMETRO <i>BOXCOUNT</i> , EM MOMENTOS ANTES, DURANTE E APÓS UM ESTÍMULO POR AUMENTO DOS NÍVEIS SANGUÍNEOS DE GLICOSE.....	101

FIGURA 63. – EFEITO DA DENERVAÇÃO DO NSC NO SNA, RESULTADO DE UMA ANÁLISE DA VFC NO DOMÍNIO DO TEMPO. ....	104
FIGURA 64. – ANÁLISE DE PARÂMETROS DESCRITIVOS DAS DISTRIBUIÇÕES DE INTERVALOS RR PARA ROEDORES SAUDÁVEIS E COM PATOLOGIA METABÓLICA, COM NSC INTACTO E RESSEÇÃO CIRÚRGICA DO NSC. ....	105
FIGURA 65. – EFEITO DA DENERVAÇÃO DO NSC NOS ÍNDICES GEOMÉTRICOS DE ANÁLISE DO HISTOGRAMA DE SÉRIES TEMPORAIS DE INTERVALOS RR.....	105
FIGURA 66. – EFEITO DA DENERVAÇÃO DO NSC NO SNA DE ROEDORES SAUDÁVEIS E COM PATOLOGIA METABÓLICA. ....	107
FIGURA 67. – EFEITO DA DENERVAÇÃO DO NSC NO SNA EM ANIMAIS SUJEITOS A UMA DIETA NORMAL E A UMA DIETA HIPERCALÓRICA. ....	109
FIGURA 68. – REPRESENTAÇÃO DA VARIAÇÃO DO PARÂMETRO <i>BOXCOUNT</i> , RESULTADO DE UMA ANÁLISE DO GRÁFICO DE POINCARÉ, PARA ANIMAIS COM E SEM PATOLOGIA METABÓLICA COM NSC INTACTO E SUJEITOS A RESSEÇÃO CIRÚRGICA DO NSC. ....	110
FIGURA 69. – EFEITO DE DIETAS HIPERCALÓRICAS E DA DENERVAÇÃO DO NSC NO SNA DE ROEDORES SAUDÁVEIS E DE ROEDORES COM PATOLOGIA METABÓLICA. ....	114
FIGURA 70. – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO VALOR MÉDIO DO RÁCIO LF/HF NORMALIZADO E RESPECTIVA BARRA DE ERRO PARA OS VÁRIOS GRUPOS DE ANIMAIS ESTUDADOS AO LONGO DESTA PROJETO.....	115
FIGURA 71. – APRESENTAÇÃO DE DOIS ESPETROS DE POTÊNCIA DE DOIS ANIMAIS CONTROLO, SEM PATOLOGIA METABÓLICA.....	116
FIGURA 72. – ANÁLISE DA VFC ATRAVÉS DO CÁLCULO DA POTÊNCIA DAS VARIAÇÕES NEGATIVAS E POSITIVAS DAS DIFERENÇAS ENTRE OS INTERVALOS RR, COM A RESPECTIVA CORRESPONDÊNCIA COM O SNS E SNP. ....	117
FIGURA 73. – TACOGRAMA DE INTERVALOS RR EM FUNÇÃO DE CADA BATIMENTO CARDÍACO PARA UMA CONDIÇÃO SAUDÁVEL E UMA CONDIÇÃO DE PATOLOGIA METABÓLICA. ....	120

## Lista de Tabelas

TABELA 1. – ESQUEMATIZAÇÃO DA INFORMAÇÃO SOBRE OS VÁRIOS GRUPOS DE ANIMAIS EM ESTUDO. ....	38
TABELA 2. – CARACTERÍSTICAS GEOMÉTRICAS DAS VÁRIAS MORFOLOGIAS CONSIDERADAS DOS GRÁFICOS DE POINCARÉ. ....	54
TABELA 3. – NÚMERO DE AQUISIÇÕES CONSIDERADAS EM CADA GRUPO DE ANIMAIS, PARA O ESTUDO DO IMPACTO DE DIFERENTES DIETAS HIPERCALÓRICAS NO SISTEMA NERVOSO AUTÓNOMO (SNA). ....	68
TABELA 4. – NÚMERO DE AQUISIÇÕES CONSIDERADAS EM CADA PARÂMETRO AVALIADO POR GRUPO DE ANIMAIS. ....	69
TABELA 5. – APRESENTAÇÃO DAS FORMAS DAS DISPERSÕES DOS GRÁFICOS DE POINCARÉ OBTIDAS PARA OS VÁRIOS GRUPOS DE ROEDORES, NO ESTUDO DO IMPACTO DE DIFERENTES DIETAS HIPERCALÓRICAS. ....	77
TABELA 6. – APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS DE UMA ANÁLISE DE VARIÂNCIA UNIDIRECIONAL ( <i>ONE-WAY ANOVA</i> ) NA AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE DIFERENTES DIETAS HIPERCALÓRICAS NO SISTEMA NERVOSO AUTÓNOMO. ....	78
TABELA 7. – NÚMERO DE AQUISIÇÕES CONSIDERADAS EM CADA GRUPO DE ANIMAIS, PARA ESTUDO DA VFC NO ESTÍMULO DE ANOXIA. ....	81
TABELA 8. – NÚMERO DE AQUISIÇÕES CONSIDERADAS NO ESTUDO, PARA CADA GRUPO DE ANIMAIS, EM CONDIÇÃO DE ESTÍMULO DE GLICOSE. ....	95
TABELA 9. – NÚMERO DE AQUISIÇÕES CONSIDERADAS EM CADA GRUPO DE ANIMAIS, PARA O ESTUDO DO BLOQUEIO CIRÚRGICO DO NERVO DO SEIO CAROTÍDEO (NSC) NO SISTEMA NERVOSO AUTÓNOMO. ....	102
TABELA 10. – REPRESENTAÇÃO DAS FORMAS DAS DISPERSÕES DOS GRÁFICOS DE POINCARÉ OBTIDAS PARA OS VÁRIOS GRUPOS, NO ESTUDO DO BLOQUEIO CIRÚRGICO DO NERVO DO SEIO CAROTÍDEO. ....	108
TABELA 11. – APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS DE UMA ANÁLISE DE VARIÂNCIA UNIDIRECIONAL ( <i>ONE-WAY ANOVA</i> ) NA AVALIAÇÃO DA DENERVAÇÃO DO NSC NO SISTEMA NERVOSO AUTÓNOMO. ....	111



## SIGLAS

CEDOC	Centro de investigação de doenças crónicas, do inglês <i>Chronic Diseases Desearch Denter</i> .
SNS	Sistema nervoso simpático.
SNA	Sistema nervoso autónomo.
CC	Corpo carotídeo.
NSC	Nervo do seio carotídeo.
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca.
SNP	Sistema nervoso parassimpático.
SNC	Sistema nervoso central.
FC	Frequência cardíaca.
SDNN	Desvio padrão, do inglês <i>Standard Deviation of N-N intervals</i> .
SDNNi	Média dos desvios padrão dos intervalos N-N ao longo de 5 minutos, do inglês <i>Standard Deviation of N-N intervals in 5 minutes segment index</i> .
SDANN	Desvio padrão das médias N-N ao longo de 5 minutos, do inglês <i>Standard Deviation of the mean of N-N intervals in 5 minutes segments</i> .
rMSSD	Raíz quadrada da média do quadrado do desvio padrão, do inglês <i>Square root of the Mean of the Squares of Differences between adjacente RR intervals</i> .

SDSD	Desvio padrão das diferenças entre intervalos N-N adjacentes, do inglês <i>Standard Deviation of Differences</i> .
NN50	Número de intervalos N-N consecutivos que diferem mais de 50 ms, do inglês <i>adjacent N-N intervals differing by more than 50 ms</i> .
pNN50	Porcentagem de N-N intervalos consecutivos que diferem mais de 50 ms, do inglês <i>percentage of adjacent N-N intervals differing by more than 50 ms</i> .
Ti	Índice triangular, do inglês <i>Triangular index</i> .
TINN	Interpolação triangular, do inglês <i>Triangular Interpolation of N-N Intervals</i> .
Wmax	Largura máxima, do inglês <i>Maximal Width</i> .
Lmax	Comprimento máximo, do inglês <i>Maximal Length</i> .
CC	Conjunto central de pontos, do inglês <i>Central Cluster</i> .
ECC	Conjunto excêntrico de pontos, do inglês <i>Eccentric Cluster</i> .
ApEn	Entropia aproximada, do inglês <i>Approximate Entropy</i> .
SampEn	Entropia de amostra, do inglês <i>Sample Entropy</i> .
MSE	Entropia de múltipla escala, do inglês <i>Multiscale Entropy</i> .
IMC	Índice de Massa Corporal.
LF	Baixas frequências, do inglês <i>Low Frequencies</i> .
HF	Altas frequências, do inglês <i>High Frequencies</i> .
FFT	Transformada de Fourier, do inglês <i>Fast Fourier Transform</i> .
PAM	Pressão Arterial Média.
LF norm	Valor Normalizado das baixas frequências, do inglês <i>Low Frequencies</i>
HF norm	Valor Normalizado das altas frequências, do inglês <i>High Frequencies</i> .

# 1

## INTRODUÇÃO

A incidência e prevalência de distúrbios metabólicos, como a Obesidade ou a Diabetes Tipo 2, tem vindo a aumentar drasticamente e estima-se que este aumento continue nos próximos anos [1], [2].

A Obesidade tem sido entendida como um fator importante na fisiopatologia da desregulação homeostática da glicose pelo sistema nervoso periférico.

Foi previamente descrito, pelo grupo de investigação da professora Sílvia Conde, no Centro de Investigação de Doenças Crónicas (CEDOC), o impacto de diferentes dietas hipercalóricas na patogénese de distúrbios metabólicos. O grupo descreveu que a administração de dietas hipercalóricas a ratos Wistar provoca alterações na massa corporal, aumento da pressão arterial e resistência à insulina, de uma forma similar ao que sucede em humanos e estes resultados estão de acordo com o previamente descrito por outros autores [3].

De facto, é consensual que o consumo de dietas hipercalóricas está envolvido na patogénese de distúrbios metabólicos. Todas as dietas hipercalóricas estudadas e consideradas no presente projeto induzem o desenvolvimento de resistência insulínica, hipertensão arterial e Obesidade, em modelos animais. Algumas das dietas induzem, ainda, uma progressão para o desenvolvimento de Diabetes tipo 2 e hipertrigliceridémia [4].

O grupo da professora Sílvia descreveu, ainda, que a administração de dietas hipercalóricas a ratos Wistar provoca aumento da atividade simpática [3].

O sistema nervoso simpático (SNS) é extremamente relevante no controlo circulatório e metabólico e uma estimulação da atividade simpática implica a inibição de segregação de insulina [5].

Várias hipóteses têm surgido, na comunidade científica, procurando descrever a relação entre a patogénese de síndromes metabólicas e alterações na atividade do SNS, em particular, e do sistema nervoso autónomo (SNA), no geral.

Admite-se, atualmente, que o aumento dos níveis de insulina é um mecanismo compensatório de uma redução da captação de glicose, causado pela ativação do SNS [5].

O corpo carotídeo (CC) é descrito como um quimiorreceptor periférico localizado bilateralmente no pescoço. Quando ativado, este órgão liberta neurotransmissores que aumentam a atividade nas terminações sensitivas do nervo do seio carotídeo (NSC). Esta atividade resulta na ativação do SNS.

O grupo da professora Sílvia descreveu que o CC, para além de ser um sensor de gases no sangue, é também um sensor metabólico, respondendo à insulina, bem como que a atividade deste órgão se encontra aumentada em modelos animais pré-diabéticos e com Síndrome Metabólico.

O grupo demonstrou, ainda, que a denervação do NSC beneficia a homeostasia da glicose em animais resistentes à insulina e intolerantes à glicose [6], prevenindo e revertendo a resistência à insulina e a intolerância à glicose em modelos animais de Síndrome Metabólico e Diabetes tipo 2.

Acredita-se, então, ser conseguido o restauro da atividade do SNS, tipicamente exacerbada na patologia metabólica, pela denervação do NSC. Em animais sujeitos a esta cirurgia, foi descrita a restauração da sinalização insulínica em tecidos insulicamente sensíveis, bem como o aumento da captação de glicose pelo fígado [6].

No presente projeto são analisadas alterações autonómicas induzidas por patologia metabólica, através da análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC), em ratos Wistar. Mais particularmente, são comparados os efeitos, a nível da atividade do SNA, da exposição a diferentes dietas hipercalóricas precursoras de distúrbios metabólicos. É analisada a VFC em situações de estímulo, procurando verificar a resposta autonómica em animais com e sem patologia metabólica. Por fim, avalia-se o impacto da ressecção cirúrgica do NSC na VFC e, consequentemente, no SNA.

### **1.1. Contextualização**

As doenças metabólicas têm vindo a ganhar, ao longo dos últimos anos, um crescente destaque, consequência do aumento contínuo da sua incidência. Doenças como a Obesidade, Diabetes tipo 2 e Síndrome Metabólico têm aumentado significativamente a sua prevalência.

Em 2016, mundialmente, 1.9 mil milhões, ou seja, cerca de 39% dos adultos, apresentavam excesso de peso e 650 milhões, 13%, estavam diagnosticados como obesos [1]. Estima-se que, em 2030, 51% da população sofrerá de obesidade [7].

Por sua vez, a Diabetes afeta, atualmente, 425 milhões de adultos, ou seja, 8,8% da população adulta mundial e estima-se que, em 2045, 629 milhões de pessoas serão diabéticas, mundialmente [2]. A Diabetes tipo 2 é o tipo mais comum de Diabetes, representando 90 a 95% dos diagnósticos desta patologia [1], [2].

De uma forma sucinta, a Diabetes é caracterizada por uma deficitária produção de insulina e pela incapacidade do corpo de responder adequadamente à insulina, uma condição denominada de resistência à insulina.

O Síndrome Metabólico é diagnosticado quando o paciente apresenta três ou mais perturbações metabólicas simultaneamente, das quais: aumento do perímetro abdominal, nível de triglicéridos elevado, pressão arterial alta, hiperglicemia em jejum e baixa concentração de colesterol HDL [9]. Estas características são averiguadas por comparação aos valores de referência.

A Obesidade é descrita como a acumulação anormal ou excessiva de gordura, o que pode prejudicar a saúde [1].

O crescente aumento destes distúrbios metabólicos e as suas implicações na saúde e estilo de vida dos doentes representa um problema com consequências económicas e sociais, tornando essencial a compreensão dos mecanismos biológicos e a identificação de estratégias de prevenção e tratamento para estas patologias.

Em estudos recentes, no âmbito da patogénese destas patologias, foi sugerido que o CC, nos mamíferos, para além de desempenhar um papel sensitivo na regulação da homeostasia, desempenha, também, funções sensitivas metabólicas [10], [11]. Foi descrito que a hiperestimulação crónica do CC está envolvida na etiologia da resistência à insulina e que a ressecção cirúrgica do NSC evita o desenvolvimento de alterações metabólicas [12], [5].

O estudo do circuito neural associado à resistência insulínica mediada pelo CC depende do estudo das vias eferentes envolvidas nesse processo. Sendo o SNS o efector natural da ativação do CC, a compreensão da interação entre o SNS e a ação da insulina pode representar um passo fundamental. É aceite que a hiperestimulação do CC, por níveis elevados de insulina, implica a excitação do NSC, desencadeando um efeito excitatório do SNS. As patologias de alteração de metabolismo, como a resistência à insulina, caracterizam-se por uma hiperativação do SNS [5].

Sabe-se que uma análise detalhada da VFC permite averiguar sobre o SNA, em geral, e o sistema nervoso simpático e o sistema nervoso parassimpático (SNP), em particular [13].

Os estudos em curso, atualmente, sobre estas patologias, centram-se não só na compreensão dos mecanismos de metabolismo da glicose, mas também nas consequentes perturbações a nível cardiovascular.

Está estudado que a Diabetes, a Obesidade e o Síndrome Metabólico são relevantes fatores de risco para as doenças cardiovasculares, sendo esta a maior causa de morte em pessoas com estas patologias [7], [8], [9].

Portadores de patologias metabólicas têm uma maior tendência para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como hipertensão, aterosclerose e paragem cardíaca [15], [9].

Em suma, a Obesidade é um dos fatores associados ao Síndrome Metabólico. O Síndrome Metabólico e a Obesidade aumentam o risco de desenvolvimento de Diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e distúrbios associados ao SNA [7], [8].

### **1.2. Objetivos específicos do projeto**

O presente projeto pretende confirmar a forma como o SNA é influenciado pela patologia de resistência à insulina e compreender as implicações a nível cardiovascular da ressecção do NSC, procurando esclarecer se esta intervenção cirúrgica é capaz de retroceder os efeitos da patologia.

Foi descrito que a hiperestimulação crónica do CC está envolvida na etiologia da resistência à insulina induzida por dieta hipercalórica e que a ressecção cirúrgica do NSC evita o desenvolvimento de alterações metabólicas [5].

Assim, acredita-se que o bloqueio cirúrgico do NSC possa prevenir possíveis complicações de origem nervosa, como cardíacas ou vasculares, em doentes diabéticos, representando uma terapêutica inovadora para estas situações clínicas.

Animais roedores, como os ratos, têm uma grande semelhança com humanos, a nível da fisiologia de órgãos, metabolismo e composição bioquímica do sangue. Assim, modelos destes animais têm vindo a ser utilizados para o estudo experimental de patologias metabólicas [4].

Pretende-se determinar o balanço vago-simpático, ou SNS-SNP, em ratos sem patologia, em ratos diabéticos tipo 2 e em ratos sem patologia e diabéticos tipo 2 com denervação do NSC, através da análise da VFC. A análise da VFC permite avaliar o equilíbrio entre os componentes simpáticos e parassimpáticos do sistema nervoso autónomo [16]. Esta análise deverá ser o mais detalhada possível, para garantir resultados fidedignos. Assim, serão considerados diferentes domínios de estudo da VFC.

Numa primeira instância, torna-se relevante avaliar a influência de diferentes dietas hipercalóricas na VFC e, assim, aferir sobre como o SNA é afetado por cada uma das dietas hipercalóricas em estudo. Numa segunda instância, verificar o efeito de diferentes estímulos sobre a VFC e, portanto, sobre o SNA. Torna-se, então, importante averiguar a forma como a resposta aos estímulos varia em função da presença ou não de patologia de resistência à insulina. Deste modo, será efetuada uma análise comparativa entre a resposta a estímulos em roedores saudáveis e em roedores resistentes à insulina.

Uma análise comparativa da VFC em modelos animais patológicos com e sem submissão a resseção cirúrgica do NSC permite verificar variações a nível cardíaco desta resseção, bem como averiguar acerca da atividade do SNA, mais concretamente da via simpática, a qual se encontra hiperestimulada em condições de patologia metabólica. Uma compreensão da atividade destes sistemas em modelos animais diabéticos submetidos a bloqueio cirúrgico do NSC apresenta-se, então, como um grande contributo para o progresso da medicina nesta patologia.

Sucintamente, o objetivo geral desta dissertação é avaliar, comparativamente, a atividade do SNA em modelos animais de ratos com e sem patologia metabólica, bem como em ratos, com e sem patologia, sujeitos a resseção cirúrgica do NSC, avaliando a fiabilidade deste procedimento enquanto terapêutica. Os objetivos específicos são analisar o impacto, no SNA, de diferentes dietas hipercalóricas potenciadoras de distúrbios metabólicos e analisar a resposta autonómica, a um estímulo metabólico e a um estímulo não metabólico, em animais com e sem patologia, procurando diferenciar, tendo por base a atividade do SNA entre um animal saudável e um animal patológico. A análise da atividade do SNA é conseguida por análise da VFC.



## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E ENQUADRAMENTO TEÓRICO

Para a compreensão global dos objetivos deste projeto, alguns conceitos, que serão abordados nesta dissertação, devem ser esclarecidos.

A análise da VFC é reflexo da atividade do SNA, tornando-se essencial fazer referência aos conteúdos teóricos inerentes ao sistema nervoso autônomo e ao sistema cardiovascular.

Uma breve introdução aos métodos de análise de VFC será apresentada, bem como uma referência teórica ao CC, à sua anatomia, fisiologia e funcionamento. A fisiopatologia da resistência insulínica será, também, abordada.

Estas noções permitem estabelecer uma relação entre a VFC e a resistência insulínica.

### 2.1. Sistema nervoso autônomo

O sistema nervoso divide-se em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico, no qual se inclui o SNA, de acordo com as suas características anatómicas e fisiológicas.

O SNC recebe e integra informação, armazena informação sob a forma de memória e inicia reações, ao nível do encéfalo. O sistema nervoso periférico inclui os nervos cranianos e raquidianos, desempenhando funções sensoriais, sensitivas e motoras [17]. O SNA é um dos sistemas integrantes do sistema nervoso periférico.

O SNA é responsável pela maioria dos reflexos fisiológicos, tendo influência sobre vários órgãos e sistemas, dos quais são exemplos a atividade cardíaca, o controlo da pressão arterial, a regulação da temperatura corporal, entre outros [17]. A principal função do SNA é garantir a homeostasia, ou seja, a manutenção das condições estáveis do organismo, independentemente do ambiente externo.

Este subsistema do sistema nervoso, o SNA, é ativado, maioritariamente, por centros sensitivos localizados na medula espinal, tronco cerebral e hipotálamo [17]. A ativação destes centros recetores desencadeia respostas reflexas inconscientes nos respetivos órgãos efetores.

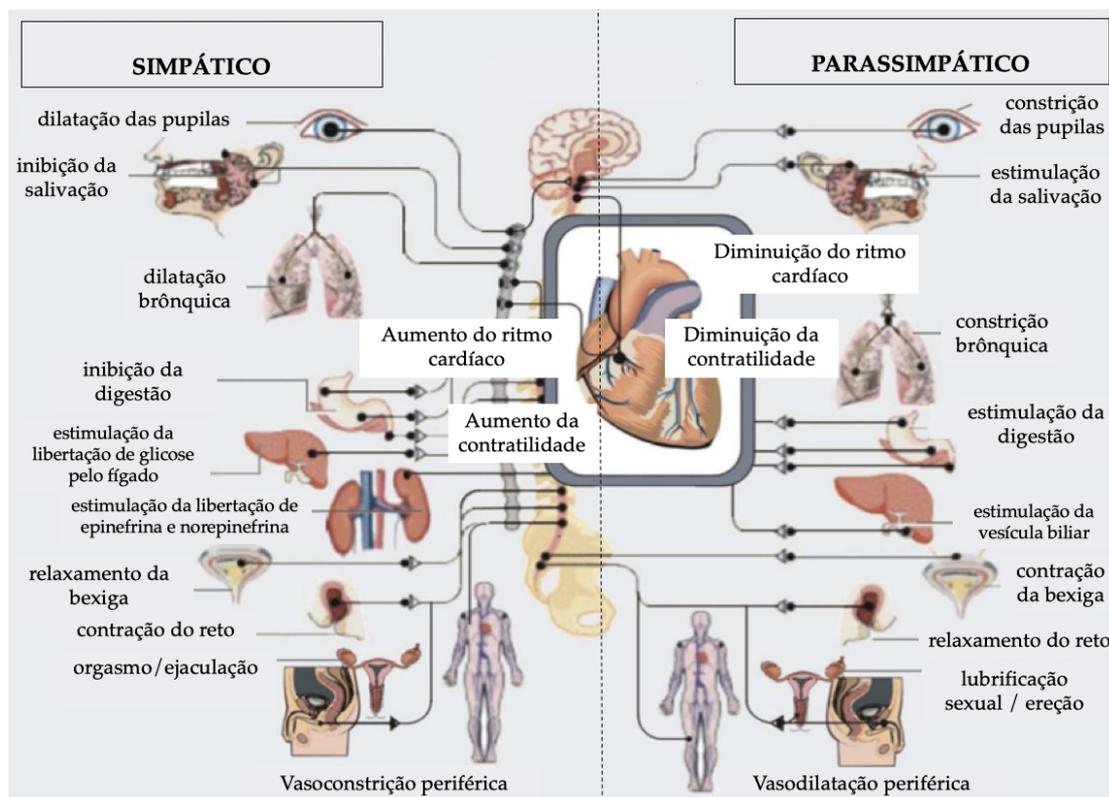
Os sinais autonómicos são transmitidos por duas grandes vias, o sistema nervoso simpático (SNS) e o sistema nervoso parassimpático (SNP) até aos respetivos órgãos efetores [17]. Alguns autores consideram, ainda, uma terceira via, o sistema nervoso entérico, o qual será responsável pelo controlo do sistema gastrointestinal [18].

As formas de atuação do SNS e do SNP são paralelas e, classicamente, opostas. O SNS assume um papel, essencialmente, excitatório, respondendo em situações de *stress*, por exemplo, através do aumento do ritmo cardíaco. Por oposição, o SNP atua, principalmente, numa forma inibitória, reduzindo a atividade cardíaca [17], [16], [18]. A rápida resposta do SNS faz com que esta seja frequentemente denominada como uma resposta de *fight and flight* e a resposta SNP *rest and digest*.

O sistema nervoso controla a circulação sanguínea e a atividade cardíaca, maioritariamente através do SNA. O SNS é o subsistema que maior influência tem sobre a regulação da circulação, regulando a pressão sanguínea, sendo o principal agente no controlo circulatório e metabólico [5], enquanto que o SNP atua, essencialmente, a nível da atividade cardíaca [17]. A Figura 1 ilustra o papel destas duas vias do SNA nos vários órgãos.

A transmissão de informação ao longo das vias simpática e parassimpática do SNA, bem como de todo o sistema nervoso, dá-se através de fenómenos eletroquímicos, sendo mediada por neurotransmissores. Os neurotransmissores são moléculas reconhecidas pelas células-alvo que medeiam a excitação, por meio de alterações de permeabilidade, com consequente alteração de carga elétrica no meio intracelular das células excitáveis.

Os principais neurotransmissores mediadores da informação simpática são a epinefrina, ou adrenalina, e a norepinefrina, ou noradrenalina. Por outro lado, o neurotransmissor mais relevante na transmissão de informação parassimpática é a acetilcolina [20].

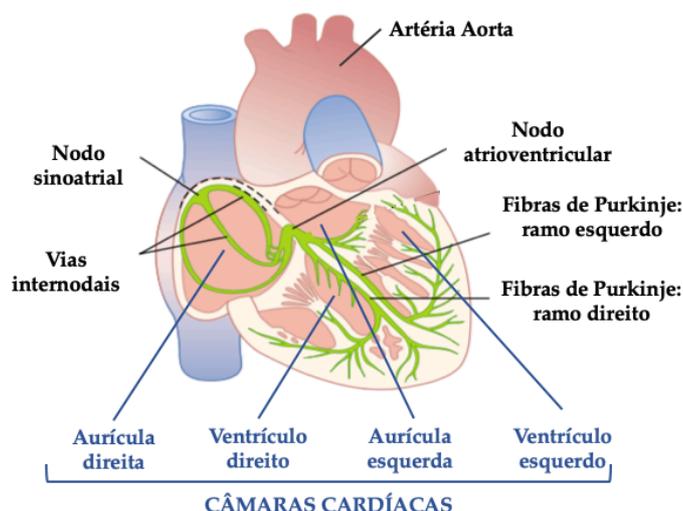


**Figura 1.** – Diagrama ilustrativo do papel, sobre os vários órgãos, das duas vias do sistema nervoso autônomo: simpática e parassimpática. Adaptado de [20].

## 2.2. Sistema cardiovascular

O sistema cardiovascular representa o conjunto do coração e dos vasos sanguíneos, que no seu coletivo são responsáveis pela vascularização, fornecendo os nutrientes necessários aos vários tecidos, por via da circulação sanguínea [21].

A contractilidade do coração, propriedade que lhe confere a sua característica de bombeador do sangue, dá-se graças à transmissão de impulsos elétricos, por geração de potenciais de ação, ao longo das células com capacidade excitatória presentes no coração. Estes impulsos têm origem, geralmente, no nodo sinoatrial ou no nodo atrioventricular, células autoexcitáveis, transmitindo-se ao longo das câmaras do coração através das fibras de Purkinje [17], [22]. A Figura 2 representa o percurso da transmissão do impulso nervoso ao longo do músculo cardíaco, bem como a disposição das câmaras cardíacas.



**Figura 2.** –Ilustração da transmissão do impulso elétrico ao longo das células excitáveis do coração dos mamíferos e representação das quatro câmaras cardíacas.

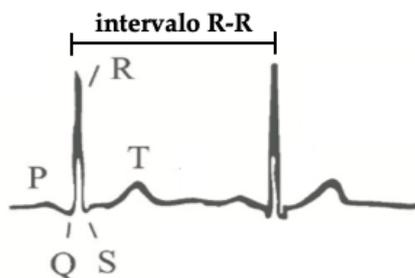
Adaptado de [17] e [22].

Os potenciais de ação são originados por alterações de carga elétrica, consequência de correntes elétricas estabelecidas por diferenças de concentrações entre os meios interno e externo das membranas das células excitáveis, gerando impulsos elétricos (despolarização). A transmissão destes impulsos às células cardíacas com capacidade contráctil promove a contractilidade do coração, dando origem aos batimentos cardíacos.

A contração cardíaca ocorre de forma faseada entre as câmaras constituintes do coração, originando um sinal elétrico que pode ser medido diretamente, com utilização de eléctrodos, eletrocardiografia, ou estimado por derivação da curva de pressão arterial média. A pressão arterial mede, de uma forma indireta, a força que o coração exerce sobre as paredes das artérias ao bombear o sangue, por medição da pressão nas artérias e extrapolação da pressão no interior deste órgão. A pressão arterial representa um método de inferir sobre a atividade cardíaca [17].

O sinal eletrocardiográfico é o sinal elétrico obtido pela monitorização da atividade elétrica cardíaca e é um sinal conhecido e amplamente estudado, caracterizado por uma sequência específica de ondas.

A atividade elétrica do coração encontra-se representada na Figura 3. Cada batimento cardíaco corresponde a um sinal elétrico conhecido. Este sinal é caracterizado por uma sequência de ondas com amplitudes distintas.



**Figura 3.** – Representação do sinal elétrico oriundo da atividade cardíaca: dois batimentos cardíacos consecutivos.

Adaptado de [23].

A onda P ocorre aquando da contração das aurículas. O complexo QRS representa a despolarização e conseqüente contração dos ventrículos. Em simultâneo, dá-se a repolarização das aurículas, sinal de menor amplitude, ocultado pela elevada amplitude do QRS. Por fim, num batimento cardíaco, dá-se a repolarização dos ventrículos, assinalada pela onda T [17].

Alterações do batimento cardíaco podem ser resultado de complicações associadas à Diabetes [23].

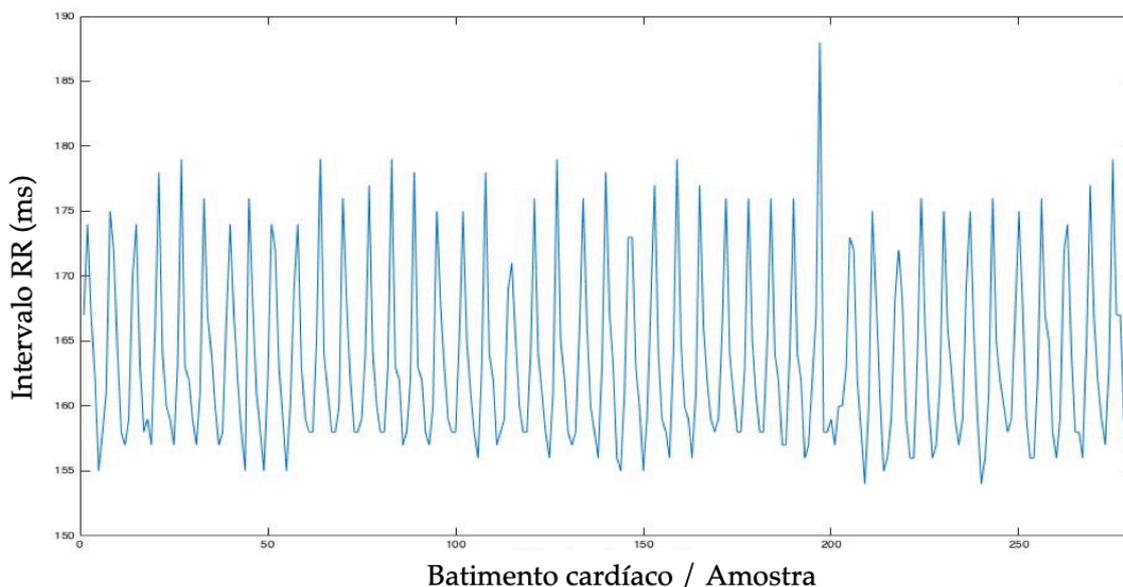
Os batimentos cardíacos não se dão de forma estritamente regular em intervalos de tempo uniformes, ocorrendo alterações na frequência cardíaca (FC), conhecidas como variabilidade da frequência cardíaca (VFC). Estas flutuações representam a capacidade de adaptabilidade por parte do sistema cardiovascular, sendo indicadoras de uma boa condição de saúde [16].

### **Variabilidade da Frequência Cardíaca:**

Enquanto a FC mede o número de batimentos cardíacos num dado período de tempo, tipicamente, de um minuto, pela contagem de ondas R consecutivas, a VFC representa as oscilações no intervalo RR de batimentos cardíacos consecutivos [19].

Estas variações descritas pela VFC estão associadas à ação do SNA sobre o sistema cardiovascular, nomeadamente, sobre o nodo sinoatrial. A VFC é comumente utilizada para estudos e avaliação da atividade do SNA em investigação cardiovascular [24].

A partir dos intervalos RR é possível construir tacogramas de frequências, gráficos que ilustram as alterações na FC, ou seja, a VFC. Na Figura 4 apresenta-se um exemplo de um tacograma de um rato saudável.



**Figura 4.** – Representação da VFC para um rato Wistar saudável: tacograma de frequências (intervalo temporal RR ao longo de vários batimentos cardíacos).

A VFC é o resultado de vários fatores de cariz fisiológico que regulam a FC. Uma baixa da VFC pode ser sinal de patologia ou de deficiente adaptação ou funcionamento do SNA [19].

Tipicamente, a atividade da via simpática do SNA tende a aumentar a FC e a diminuir a VFC. Por outro lado, o SNP tem tendência a diminuir a FC e a aumentar a VFC [24].

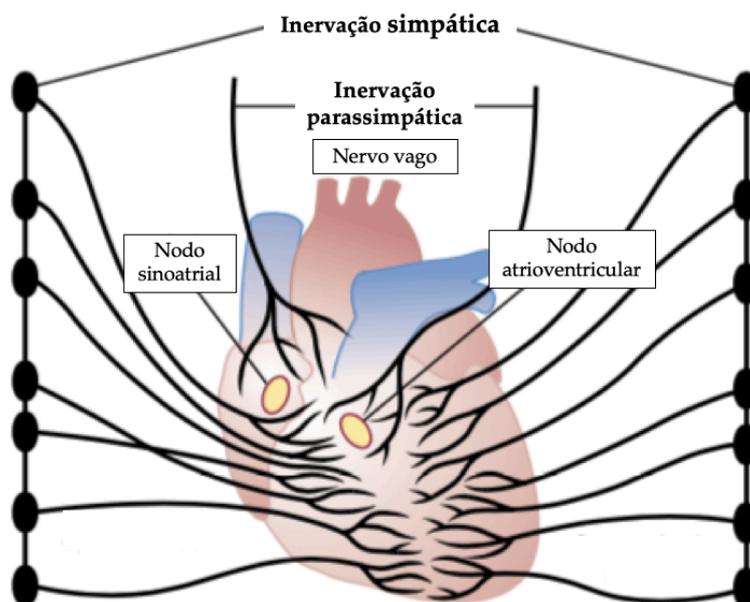
### **2.3. Relação entre o sistema nervoso autónomo e o sistema cardiovascular**

A VFC mede variações no intervalo entre batimentos cardíacos consecutivos. Estas oscilações são resultado de interações complexas e não-lineares. A VFC é uma medida da função cardio-neurológica, representando as interações entre o cérebro e o coração, bem como o funcionamento do SNA.

É certo que muita instabilidade no sinal de VFC indique prejuízo para o funcionamento fisiológico, mas uma baixa variação será, também, sinal de patologia.

A atividade do coração, bombeamento do sangue, é controlada pelos nervos simpáticos e parassimpáticos (nervo vago), os quais irrigam abundantemente o coração, como se pode observar na Figura 5.

A estimulação simpática aumenta o ritmo cardíaco e a força de contração do coração, aumentando, conseqüentemente, o volume de sangue bombeado e a sua pressão de ejeção. Por outro lado, a estimulação parassimpática implica uma diminuição do ritmo cardíaco e da força de contração. De notar que a irrigação parassimpática, a qual ocorre via nervo vago, tem maior destaque ao nível das aurículas do que dos ventrículos, justificando que a diminuição da força de contração registada, por estimulação parassimpática, não seja tão significativa [17].



**Figura 5.** – Inervação simpática e parassimpática (ou vagal) do coração.  
Adaptado de [17].

A propagação dos impulsos elétricos no coração é controlada pelo SNA, pelas vias simpática e parassimpática, através de neurotransmissores. A atividade do SNP é tipicamente mediada pela libertação de acetilcolina pelo nervo vago. Por outro lado, a atividade do SNS é mediada pela libertação de adrenalina.

A atividade do SNA pode ser monitorizada através da análise da VFC e/ou da concentração de noradrenalina no plasma.

A regulação do ritmo cardíaco por meio do SNA é resultado da atuação do sistema nervoso sobre o nodo sinoatrial, regulando o ritmo cardíaco, com alteração da frequência cardíaca e da força contráctil do coração.

### 2.3.1. Barorreflexo

O barorreflexo é um reflexo mediado pelos sensores de pressão sanguínea, os barorreceptores, presentes nas artérias aorta e carótida. O seu papel é a regulação da pressão sanguínea.

Os barorreceptores são sensíveis às alterações morfológicas da artéria, como o seu alongamento quando aumenta a pressão sanguínea.

Quando a pressão sanguínea aumenta, o barorreflexo causa, imediatamente, a redução do ritmo cardíaco. Por outro lado, se a pressão sanguínea diminui, o barorreflexo provoca o aumento do ritmo cardíaco. Estas respostas imediatas são mediadas pelo SNA, pelas vias simpática e parassimpática [25], [26].

O barorreflexo transforma a variabilidade da pressão sanguínea em variabilidade da frequência cardíaca [26]. Este é um exemplo de um reflexo neurocardíaco, ilustrando a relação direta entre o SNA e o sistema cardiovascular.

## 2.4. Métodos de análise da VFC

A análise de dados de VFC pode ser feita com recurso a dois grandes tipos de modelos: modelos lineares e modelos não lineares, no domínio do tempo e da frequência [19], [23], [27], [28]. Os modelos não-lineares têm por base a Teoria do Caos [29] e assumem a não-linearidade dos sistemas.

Os parâmetros para medição e análise da VFC foram estabelecidos, em 1996, pela Task Force of the European Society of Cardiology e pela North American Society of pacing and Electrophysiology [59].

### 2.4.1. Métodos lineares no domínio do tempo

No domínio do tempo, os modelos utilizados são relativamente simples e obtêm-se pela interpretação direta dos intervalos RR, com resultados em unidades de tempo (tipicamente, em milissegundos).

São utilizados, classicamente, os parâmetros de seguida enumerados [16], [23], [27], [28], [18]:

- Média – média dos intervalos RR – média aritmética dos intervalos de tempo entre dois batimentos cardíacos consecutivos, intervalos RR;
- SDNN – desvio padrão de todos os intervalos RR consecutivos, denominados agora NN intervalos, referindo-se a batimentos cardíacos normais, ou seja, com origem no nodo sinoatrial (normal-normal intervalo). Este parâmetro reflete a variação global dos intervalos RR;

- SDNNi – média dos desvios padrão de todos os intervalos NN de 5 minutos, de um registo de 24 horas;
- SDANN – desvio padrão das médias dos intervalos NN ao longo de 5 minutos, de um registo de 24 horas;
- rMSSD – raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos N-N consecutivos;
- SDD – desvio padrão das diferenças entre intervalos N-N adjacentes;
- NN50 – número de intervalos RR consecutivos que diferem mais de 50 ms;
- pNN50 – percentagem de intervalos RR consecutivos que diferem mais de 50 ms, em unidades percentuais.

Os indicadores SDNN, SDNNi e SDANN são resultado de registos de longa duração, englobando efeitos de origem simpática e parassimpática, ou vagal, não permitindo inferir se os efeitos se devem a efeitos simpáticos ou vagais. Por outro lado, os parâmetros rMSSD e NN50, ou pNN50, transmitem informação de origem simpática, ao representarem valores referentes a batimentos consecutivos, [19]. SDNN reflete, globalmente, variabilidade total, enquanto que rMSSD infere acerca de variações de alta frequência do ritmo cardíaco. Ambos refletem flutuações na atividade do SNA e a média dos intervalos RR pode ser considerada como medida da soma da atividade do SNS e do SNP [31].

Os parâmetros em epígrafe são, em particular, para uma aplicação em humanos. Para uma análise da VFC em roedores vertebrados, algumas adaptações devem ser executadas, adequando a análise às características específicas dos animais.

Os índices NN50 e pNN50 perdem significado quando aplicados a roedores, pelas diferenças nos valores de FC e intervalos RR típicos nestes animais. Assim, da mesma forma que o limite de 50 milissegundos é definido para o homem, partindo do seu valor médio de RR (cerca de 10% da média do intervalo RR estabelecido como padrão), para ratos deve ser considerado um limite menor. Alguns autores consideram, também, o limite de 20 milissegundos em humanos. Assim, em modelos animais de roedores, este limite de 20 milissegundos pode ser considerado, mas alguns autores defendem que o valor ótimo, que permite uma informação mais detalhada e rigorosa, será 6 milissegundos, ao ser o valor que melhor refletirá a atividade parassimpática [16].

No contexto deste projeto, serão, então, considerados os seguintes parâmetros de análise da VFC:

- NN20 – número de intervalos RR consecutivos que diferem mais de 20 ms;

- pNN20 – percentagem de intervalos RR consecutivos que diferem mais de 20 ms;
- NN6 – número de intervalos RR consecutivos que diferem mais de 6 ms;
- pNN6 – percentagem de intervalos RR consecutivos que diferem mais de 6 ms.

Um elevado e aproximadamente irregular valor de VFC implicará um maior valor do parâmetro SDNN [30].

Além dos métodos estatísticos apresentados, pode-se recorrer a métodos geométricos para a análise no domínio do tempo. O método geométrico mais utilizado em contexto de VFC é o índice triangular, a saber [16], [23], [27], [28], [18]:

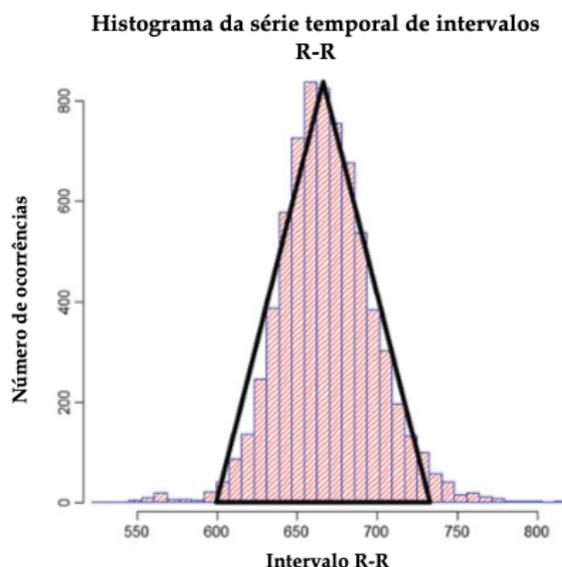
- Índice triangular da VFC – uma vez construído o histograma de densidade dos intervalos RR (comprimento do intervalo – eixo xx – em função da frequência com que cada ocorre – eixo yy), a união das colunas do histograma forma uma figura triangular, onde a largura da base do triângulo corresponde à VFC. O número total de intervalos RR a dividir pela duração mais comum do intervalo é o valor do índice triangular (Ti). Considerando o comprimento da série temporal de intervalos RR como N, tem-se:

$$Ti = \frac{N}{\max(\text{histograma}(\text{RR}))} \quad (2.1)$$

- Interpolação triangular (TINN) – é calculado pelo valor da largura da linha que representa a base do triângulo. De acordo com a geometria da figura triangular, pode-se calcular a TINN pela razão entre a área do triângulo e a sua altura, multiplicada por dois. Considerando o comprimento da série temporal de intervalos RR como N e tendo em conta a dimensão de cada bin do histograma construído, tem-se:

$$TINN = \frac{N \times \text{dimensão bin}}{\max(\text{histograma}(\text{RR}))} \times 2 \quad (2.2)$$

Na Figura 6 está representada a forma como este método se aplica ao histograma de intervalos RR.



**Figura 6.** – Histograma de densidade dos intervalos RR e ilustração da análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), tendo por base o método do Índice triangular da VFC. Adaptado de [18].

### 2.4.2. Métodos lineares no domínio da frequência

Os métodos de análise no domínio da frequência correspondem a uma análise da densidade do espectro de potência [27], [28], [32].

A análise total do espectro de potência é conseguida por uma análise detalhada de várias regiões de frequências. Em humanos, na literatura, considera-se recorrentemente que a gama de frequências inferiores a 0,003 hertz representa as frequências ultrabaixas; de 0,003 a 0,04 Hz as frequências muito baixas; de 0,04 a 0,15 Hz as baixas frequências; de 0,15 a 0,4 Hz as altas frequências.

Para análise da VFC em animais roedores, são consideradas como padrão as seguintes componentes de frequência [16]:

- Baixas frequências (LF) – entre 0,15 e 1,5 Hz – a potência das baixas frequências é modulada pelo SNS e pelo SNP [33]. Um aumento das baixas frequências é tipicamente considerado consequência da atividade simpática [34] e, como tal, alguns autores consideram a atividade simpática predominante nas LF [18];
- Altas frequências (HF) – entre 1,5 e 5 Hz – a potência das altas frequências é tipicamente modelada pelo SNP, mas contém uma forte componente de origem respiratória, representando a influência da frequência de respiração [33].

Num estudo deste âmbito é tipicamente calculado, também, o valor de *power spectral density* (PSD), o qual é um estimador da potência espectral total [27], [28], [32]. Este parâmetro indica a densidade de potência total do espectro neste caso, corresponderá à potência de densidade nas LF e HF. Assim, o parâmetro PSD calcula a densidade de potência das frequências de 0,15 a 5 Hz. As frequências abaixo deste limiar são desprezadas pela sua insignificância para o contexto.

É consensual na comunidade científica que a potência das HF representa o controlo cardíaco vagal e que a potência das LF reflete a regulação simpática do ritmo cardíaco [19].

A razão entre a potência espectral das baixas e das altas frequências (LF/HF) reflete a relação entre o SNS e o SNP, podendo ser utilizada como parâmetro de medida do equilíbrio simpático-vagal [35]. Um valor elevado deste rácio indica uma prevalência da atividade do SNS, enquanto que o predomínio da atividade do SNP resultará em valores mais baixos [18].

No seguimento de uma análise no domínio das frequências, a Transformada de Fourier (FFT) é o algoritmo mais utilizado, pela sua facilidade de aplicação. A FFT permite obter uma estimativa da potência espectral e é aplicável em zonas estacionárias do sinal [19]. É obtida pela integração do espectro ao longo das várias componentes de frequência. Os intervalos RR obtidos são transformados em bandas com frequências espectrais distintas [34].

Outras transformadas podem ser consideradas, para a obtenção de uma análise tempo-frequência, como é o caso da transformada discreta de wavelets ou a transformada de Hilbert-Huang. Estas transformadas seguem as mesmas considerações que a transformada de Fourier, mas com uma representação do sinal sob formas distintas, sendo que a análise de Fourier considera qualquer sinal como a soma de funções sinusoidais.

A transformada de Fourier apenas pode ser aplicada a sinais estacionários e não informa sobre a duração e localização temporal, fornecendo apenas informação sobre as componentes de frequência e as respetivas amplitudes. A transformada de wavelets ou a transformada de Hilbert-Huang permitem esta análise, construindo espectros de frequência em função do tempo [36].

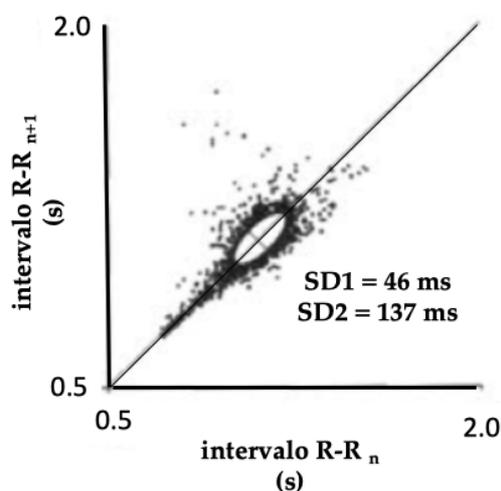
### **2.4.3. Métodos não lineares**

Os métodos não-lineares têm vindo a ganhar cada vez mais interesse e relevância, por se acreditar que a regulação fisiológica associada à FC depende da interligação de vários sistemas de uma forma dinâmica, não linear [29], [37], [38].

Os parâmetros mais utilizados para uma análise não linear da VFC são:

**A. Gráfico de Poincaré** – representação gráfica a duas dimensões dos intervalos RR em função do intervalo RR seguinte. O gráfico de Poincaré é resultado de uma análise de cada intervalo  $RR_{i+1}$  como função do intervalo  $RR_i$  anterior. Tipicamente, apresenta uma forma semelhante a uma elipse. São considerados dois parâmetros para a análise deste tipo de gráficos: SD1 descreve o eixo mais curto da elipse e SD2 o eixo mais longo. Este eixo mais longo da elipse (SD2) é contruído sobre a reta de equação  $y = x$ . SD12 representa a razão entre SD1 e SD2.

Na Figura 7 é apresentado um exemplo de representação de intervalos RR sob a forma de gráfico de Poincaré.



**Figura 7.** – Representação de um Gráfico de Poincaré, com apresentação de exemplos de valores dos parâmetros para análise (SD1 e SD2).

Adaptado de [37].

Por forma a tornar mais perceptível a abordagem ao estudo da VFC pelo gráfico de Poincaré, considere-se a série temporal de intervalos RR,  $x_n$ , em milissegundos. Denote-se os vários termos da série por:  $x_0, x_1, x_2, x_3, x_4, \dots$ . A apresentação destes dados sob a forma de gráfico de Poincaré resultará num gráfico dos pontos  $(x_0, x_1), (x_1, x_2), (x_2, x_3), \dots$  e a forma deste gráfico será reflexo da variabilidade da série temporal.

Para uma interpretação do gráfico de Poincaré pode-se recorrer a uma análise qualitativa ou quantitativa.

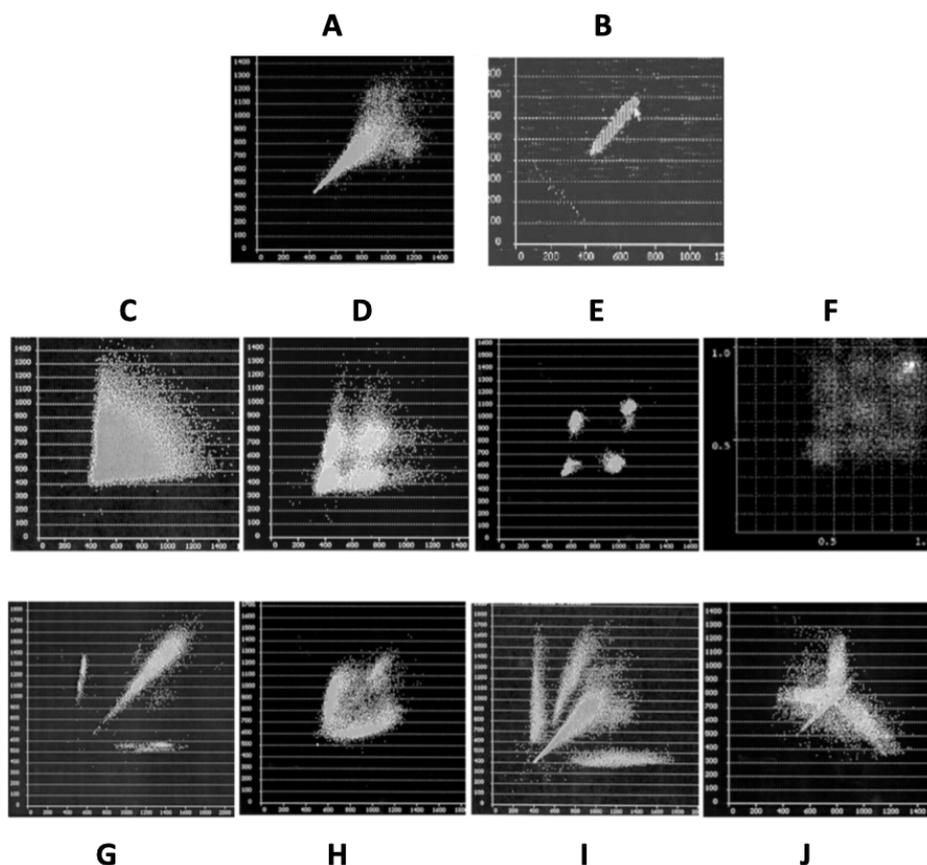
Os parâmetros tipicamente utilizados para caracterização do gráfico de Poincaré são SD1 e SD2. Estes valores são obtidos considerando uma elipse ajustada

tada à forma do gráfico. SD1 corresponde, então, ao eixo curto desta elipse, enquanto que SD2 mede o eixo longo. Assim, SD1 representa uma variabilidade instantânea, batimento a batimento, e SD2 uma variabilidade descontínua [37]. O rácio SD1/SD2 representa a aleatoriedade da série temporal da VFC [39].

Cada gráfico de Poincaré deve ser classificado de acordo com a respetiva forma e parâmetros geométricos. A geometria destes gráficos foi descrita como sendo distinta entre indivíduos saudáveis e não saudáveis [40], [41].

De acordo com a literatura, as formas mais comuns destes gráficos são forma de cometa, torpedo e elipse. Quando se trata de estudos de sinais com origem cardíaca, diferentes formas estão associadas a diferentes graus de insuficiência cardíaca [39]. Autores defendem que arritmias cardíacas específicas estão associadas a formas específicas do gráfico de Poincaré [41].

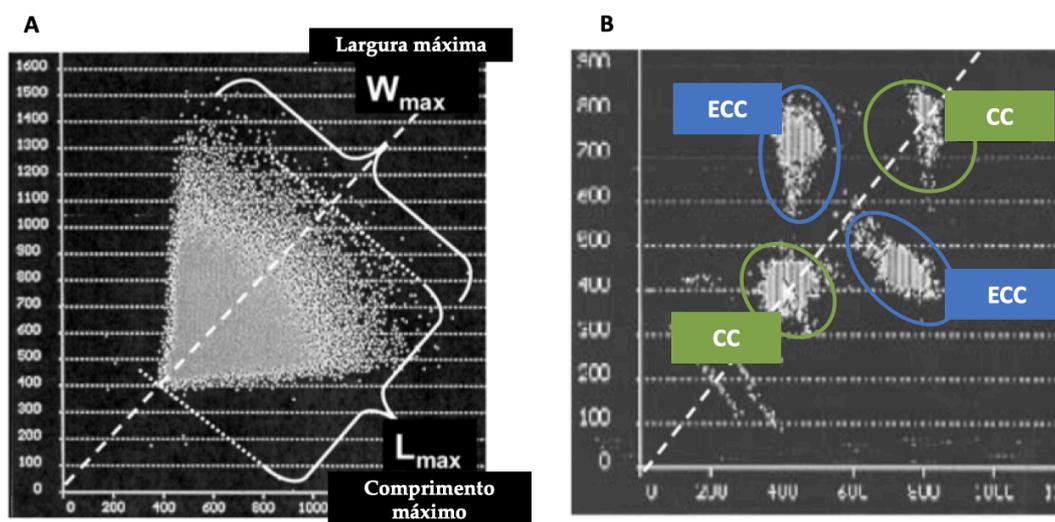
Na Figura 8 são exibidos vários exemplos de formas que os gráficos de Poincaré podem apresentar, as quais foram consideradas na classificação dos dados em estudo nesta dissertação.



**Figura 8.** – Ilustração das diferentes formas de dispersões consideradas na análise de Gráficos de Poincaré.

Classificação qualitativa das formas dos Gráficos de Poincaré: (A) forma de cometa; (B) forma de torpedo; (C) forma de leque tipo A; (D) forma de leque tipo B; (E) forma de ilha tipo A; (F) forma de ilha tipo B; (G) lóbulo lateral duplo tipo A; (H) lóbulo lateral duplo tipo B; (I) lóbulo lateral triplo do tipo A; (J) lóbulo lateral triplo do tipo B. Adaptado de [41].

Seguindo os princípios que guiaram o estudo de Esperer, et al. [41], devem ser considerados como parâmetros de referência para a identificação da forma da dispersão de Poincaré a largura máxima ( $W_{max}$ ) do *cluster* de pontos, ou seja, o comprimento máximo da projeção do conjunto de pontos dos dados ao longo da bissetriz, bem como o comprimento máximo ( $L_{max}$ ), comprimento máximo da projeção do conjunto de pontos perpendicularmente à bissetriz. A localização central ou excêntrica dos *clusters* também deve ser tida em conta, classificando-se como centrais (CC) ou excêntricos (ECC) cada um dos distintos conjuntos de pontos visíveis no gráfico de Poincaré. Na Figura 9 estão representados visualmente esses parâmetros, associados a exemplos de gráficos de Poincaré.



**Figura 9.** – Representação visual dos parâmetros geométricos utilizados para análise do gráfico de Poincaré.

Ilustração dos parâmetros: (A) comprimento e largura máximos; (B) localização central ou excêntrica dos *clusters* de pontos. Adaptado de [41].

**B. Detrended Fractal Scaling Exponent ou Detrended Fluctuation Analysis** – mede o grau de correlação entre intervalos RR, ou seja, se os intervalos RR são correlacionados, isto é, periódicos ou se, por outro lado, são aleatórios, com valores totalmente distintos. O parâmetro  $\alpha$  mede esta correlação. Este parâmetro pode ser medido em diferentes escalas, cada escala correspondendo a um número de batimentos cardíacos.

Em primeiro lugar, deve ser subtraído, à série de intervalos RR, o valor da sua média, para evitar sobreposições, resultando numa série temporal, onde  $k$  é o número de intervalos RR e  $\mu$  a média da série temporal original:

$$y_i = \sum_{i=1}^k x_i - \mu \quad (2.3)$$

De seguida, divide-se o sinal obtido em segmentos de comprimento  $n$ .

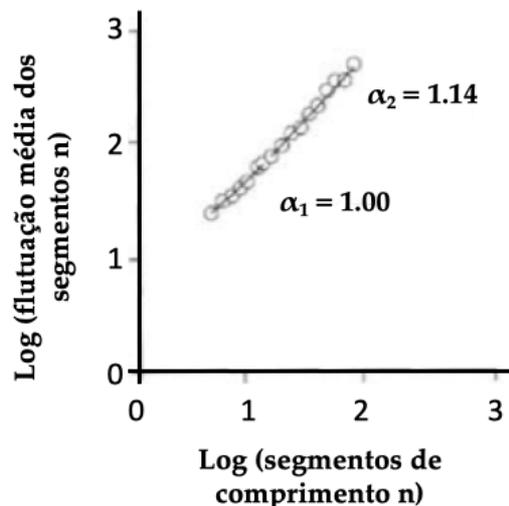
$$F_n = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - y_{i,n})^2} \quad (2.4)$$

onde a série temporal  $y_i$  é dividida em segmentos iguais de comprimento  $n$  e para cada segmento calcula-se a tendência local, ajustando uma linha de regressão  $y_{i,n}$  e  $N$  o número total de segmentos.

O valor de  $\alpha$  diz respeito ao expoente associado ao cálculo da flutuação, obtido por regressão [18], ou seja,  $F_n \propto n^\alpha$ , obtido através da inclinação da curva de relação entre o logaritmo de  $F_n$  e o logaritmo de  $n$ .

Numa escala de 3 a 11 batimentos cardíacos, um valor de  $\alpha$  de 0,5 representa intervalos RR aleatórios e um valor de 1,5 indica que os intervalos são, aproximadamente, periódicos. Um valor  $\alpha$  de cerca de 1,05 será normal [37].

A Figura 10 representa uma análise com recurso ao método *Detrended Fractal Scaling Exponent*.



**Figura 10.** – Representação da análise *Detrended Fractal Scaling Exponent* de um perfil de dados RR com apresentação de exemplos de valores dos parâmetros de análise em duas diferentes escalas.

Adaptado de [37].

C. **Declive da lei da potência** – representação logarítmica do espectro de potência em função da frequência. Para um ritmo cardíaco normal, o espectro de potência apresenta uma exponencial decrescente em frequência. Em escala logarítmica, esta exponencial será representada por uma linha, da qual se pode calcular o declive, obtendo uma relação entre potência e frequência. O decréscimo do valor do declive da reta obtida está caracteristicamente associado a complicações cardíacas [37]. Esta representação da série temporal RR é apresentada na Figura 11.

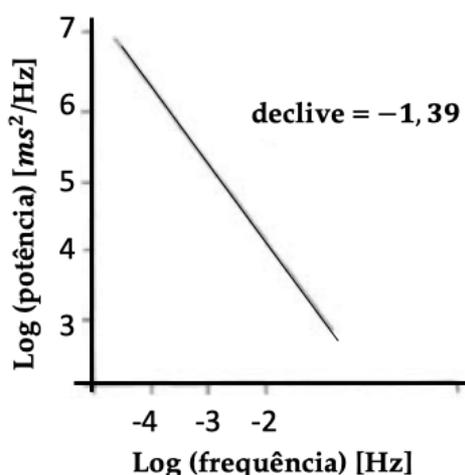


Figura 11. – Representação da análise pelo método do declive da lei da potência de um perfil de dados RR, com apresentação de um exemplo de valor para o parâmetro de análise (o declive da reta obtida).

Adaptado de [37].

D. **Approximate Entropy (ApEn)** – mede a complexidade e regularidade de uma série temporal. A entropia é definida como a perda de informação numa série temporal ou num sinal [42]. Pela literatura, este método é adequado para o estudo de séries relativamente pequenas, de 75-100 pontos [42]. É um método dependente do comprimento da série temporal em estudo [43].

E. **Sample Entropy (SampEn)** – tal como ApEn, mede o grau de aleatoriedade da série. A sua principal vantagem é ser mesmo sensível à variação da dimensão da série temporal, por oposição ao método anterior [42], [43].

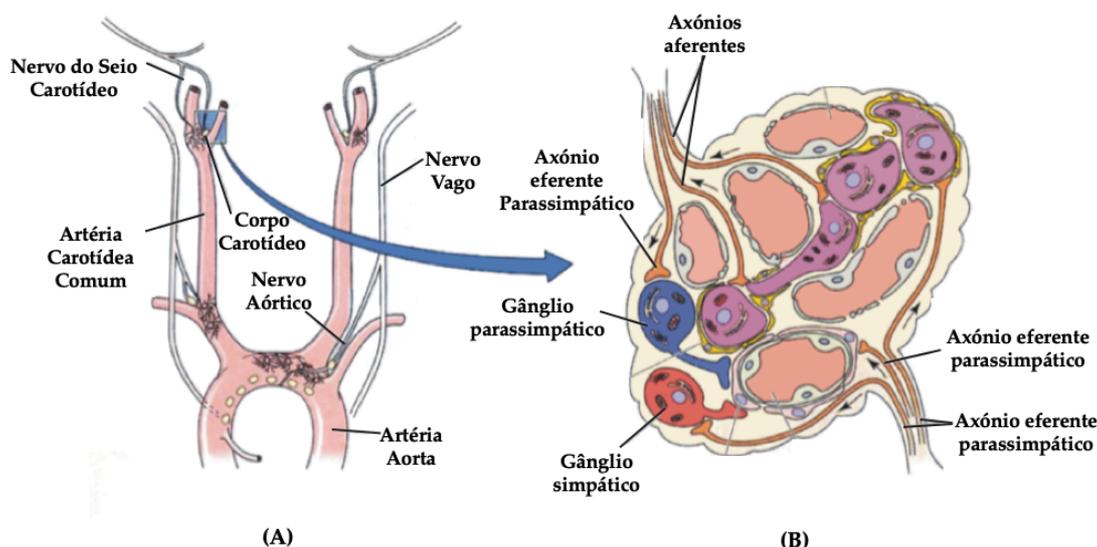
Ambos os métodos de análise de entropia apresentados dependem de valores de *inputs* específicos: o comprimento do padrão a identificar, o parâmetro relativo ao critério de semelhança do sinal e a dimensão da série.

F. **Multiscale Entropy (MSE)** – considerando uma série temporal  $\{x_1, \dots, x_i, \dots, x_n\}$  constrói-se uma série temporal  $\{y^{(\tau)}\}$ , correspondendo  $\tau$  ao fator de escala. Numa primeira fase, divide-se a série temporal original em janelas de comprimento  $\tau$  sem sobreposição. O comprimento de cada uma das novas séries obtidas será igual ao comprimento da série original dividido pelo fator de escala,  $\tau$ . Para a escala  $\tau = 1$  obtém-se a série original. Calcula-se a entropia para cada uma das novas séries [44].

Outros métodos de análise dinâmica da VFC podem ser considerados, mas os listados em epígrafe são os mais recorrentes na literatura.

## 2.5. Corpo carotídeo

O CC é um pequeno órgão par bilateral situado junto à artéria aorta, na sua bifurcação comum [45]. Na Figura 12 encontra-se uma representação da sua localização e breve descrição anatómica do CC.



**Figura 12.** – Localização e anatomia microscópica do CC: em (A) a localização do CC e em (B) a anatomia do CC.

Adaptado de [46].

A constituição do CC, a nível celular e estrutural, caracteriza-se pela presença de dois tipos distintos de células: células tipo I e células tipo II. As primeiras são descritas como os principais centros quimiorreceptores, vários neurotransmissores foram identificados neste tipo de células. Apresentam uma forma arredon-

dada. Por outro lado, as células tipo II apresentam uma forma fusiforme e desempenham um papel maioritariamente de suporte, encontrando-se em redor de aglomerados de células tipo I [47].

Este órgão é um quimiorrecetor periférico sensível a alterações de concentração de oxigénio, nomeadamente hipoxia (baixa de  $O_2$ ), e dióxido de carbono, particularmente condições de hipercapnia (excesso de  $CO_2$ ), e a alterações de pH no sangue. A consequência destas situações é o aumento da estimulação do nervo sensitivo do CC, o NSC. A informação sensitiva detetada pelo CC é transmitida aos terminais nervosos do NSC [11], pela libertação de neurotransmissores, que promovem a criação de potenciais de ação nas células nervosas do NSC [45].

Estudos concluem que o CC não deve ser visto como uma glândula, mas sim como um órgão sensitivo especializado. A sua função é a deteção de alterações nas concentrações químicas no sangue, através das suas células quimiorrecetoras [45].

A informação do NSC é processada a nível cerebral. Por forma a restabelecer o equilíbrio, são desencadeadas respostas com impacto na pressão sanguínea e na atividade cardíaca, através do SNA.

O NSC origina-se do tronco principal do nervo glossofaríngeo. O componente barorreceptor do NSC induz a inibição da simpática e o componente quimiorrecetor estimula a ativação/estimulação simpática.

O nervo vago assume um papel importante na regulação enquanto via parassimpática, sendo o principal responsável pelo controlo do ritmo cardíaco pelo SNP [48].

O CC é, assim, uma origem dos reflexos autonómicos para a regulação da homeostasia. O CC é um recetor sensitivo periférico do SNA, tendo sido recentemente descrito como um sensor de níveis de insulina.

O CC não responde diretamente a alterações de níveis de glicose no sangue, não se apresentando como um recetor periférico de hipoglicémia, como é o caso de alguns quimiorrecetores presentes no pâncreas. Por outro lado, é descrita uma relação direta entre as concentrações de insulina no sangue e a atividade do CC, levando à conclusão de que este órgão funcionará como recetor de níveis de insulina. Normalmente, uma condição de hipoglicémia é resultado de uma elevada concentração de insulina no sangue, esclarecendo a possível relação indireta entre a atividade do CC e os níveis de glicose no sangue [11].

## 2.6. A patologia de resistência à insulina

A insulina é uma hormona produzida ao nível do pâncreas. Anatomicamente, o pâncreas é constituído por diferentes células, com funções distintas. As células  $\alpha$  são responsáveis pela secreção de glucagon. As células  $\beta$  segregam insulina [49].

A ação da insulina e do glucagon são tipicamente opostas. Enquanto a primeira é responsável pela produção de glicogénio, o segundo tem um papel de estimulador do seu consumo [2]. O glicogénio é a principal reserva energética das células animais.

A produção e segregação de glucagon e insulina pelo pâncreas e a sua utilização pelo fígado são esquematizadas na Figura 13.

A concentração de glicose no sangue é regulada por um mecanismo de *feedback* que envolve o pâncreas, o fígado e outros tecidos periféricos.

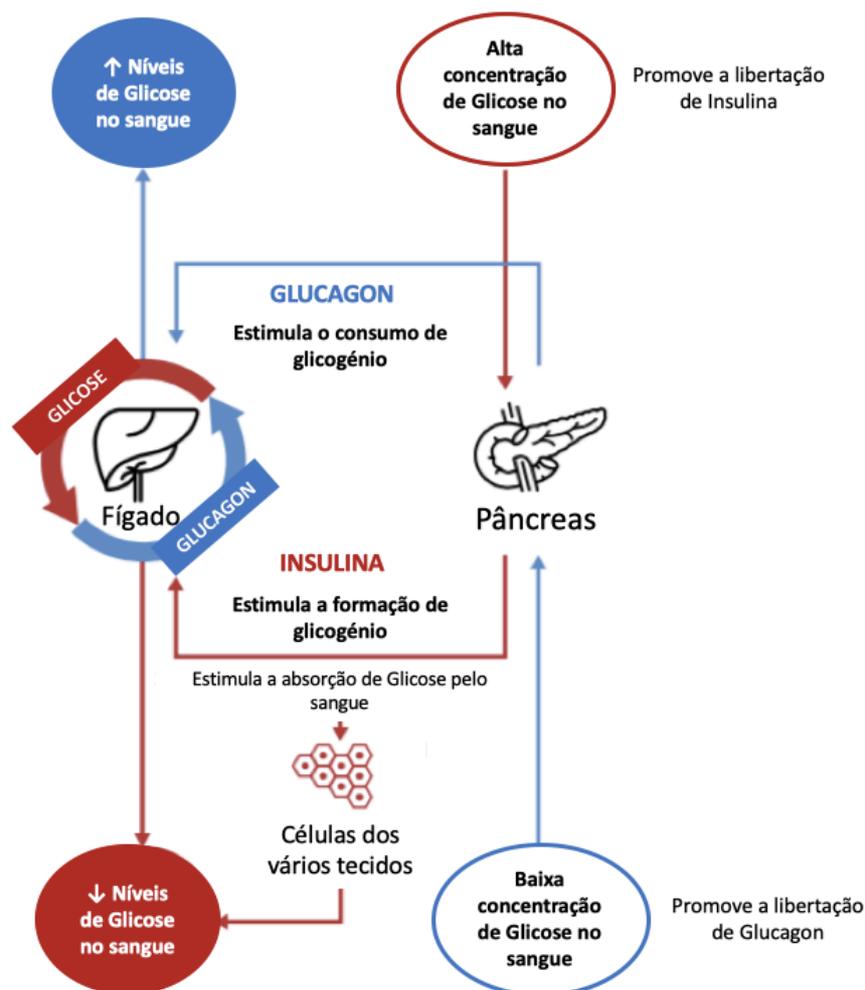


Figura 13. – Produção e ação da insulina, o papel desta hormona a nível do pâncreas e do fígado.

A vermelho, o mecanismo de resposta ao aumento da concentração de glicose no sangue e, a azul, reposta à diminuição dos níveis de glicose. Adaptado de [3].

Quando o nível de glicose se encontra aumentado, as células  $\beta$  do pâncreas libertam insulina. Esta hormona, por via hepática, inibe a degradação de glicogénio e a produção de glicose [49]. Nos tecidos periféricos, o aumento da concentração de insulina suprime a produção de glicose ao nível do rim e promove o consumo e armazenamento de glicose ao nível dos músculos [49].

Por outro lado, quando o nível de glicose no sangue diminui, a produção de insulina é inibida e as células  $\alpha$  do pâncreas segregam glucagon, molécula que estimula a produção de glicogénio no fígado [49].

O SNS é ativado em reposta a uma diminuição dos níveis de glicose no sangue. Esta ativação leva a uma segregação de epinefrina, neurotransmissor de transmissão simpática, o qual estimula a produção renal e hepática de glicose e reduz o consumo de glicose pelos músculos, contribuindo para o aumento da concentração desta molécula no plasma [49].

O SNP é igualmente importante nesta regulação. O nervo vago, principal transmissor de informação parassimpática, apresenta projeções eferentes ao nível do pâncreas e do fígado. Assim, a estimulação das suas fibras nervosas pancreáticas resulta num aumento de libertação de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas. A nível hepático, promove a redução de segregação de glicose e aumenta a formação de glicogénio [50], [51].

Conclui-se, então, que enquanto uma condição de hipoglicémia (baixa concentração de glicose no sangue) resulta na ativação simpática e aumento da produção de insulina, uma situação de hiperglicémia (aumento dos níveis de glicose no sangue) promove a ativação parassimpática e conseqüente diminuição de produção de glicose.

Uma condição de hiperinsulinemia crónica, também denominada como resistência insulínica, é caracterizada por uma redução da segregação de glicose pelo fígado, uma diminuição do metabolismo da glicose pelos músculos e uma constante concentração elevada de insulina no sangue.

A resistência insulínica ocorre quando os tecidos se encontram regularmente expostos a elevados níveis de glicose, insulina, cortisol e ácidos gordos livres. A resposta normal do organismo a esta resistência é o aumento da produção de insulina. Na Diabetes, este aumento da produção de insulina não é suficiente para manter os níveis de glicose no sangue normais [49].

A resistência insulínica está associada a uma redução da atividade parasimpática e/ou a um desequilíbrio entre a atividade do SNS e do SNP [49]. Por outro lado, tanto a insulina como a glicose têm um papel excitatório, por concentrações elevadas no sangue, do SNS. Assim, é aceite que a eventual neuropatia do SNA, em indivíduos com patologia metabólica, seja consequência de um aumento da atividade do SNS sem alteração da atividade opositora do SNP [15], a qual se encontrará reduzida.

A resistência insulínica é uma característica da Diabetes tipo 2 e tem sido associada a uma disfunção do SNP em humanos [52] e em ratos [53]. A Diabetes tipo 2 é caracterizada, para além de alterações no metabolismo da glicose, e consequente resistência à insulina, por uma disfunção nas células  $\beta$  do pâncreas [49]. O controlo da glicose, em indivíduos diabéticos, tende a agravar-se ao longo do tempo, desde os primeiros indícios de resistência insulínica, ao estado de pré-diabetes.

Uma condição de Síndrome Metabólico é diagnosticada quando se registam, simultaneamente, três ou mais das seguintes situações: o indivíduo apresenta obesidade central, ou seja, um perímetro da cintura superior a 101,6 centímetros, em homens, e 88,9 centímetros, em mulheres; um valor de triglicéridos igual ou superior a 150 mg/dL; níveis de HDL inferiores a 40 mg/dL em homens e a 50 mg/dL em mulheres; pressão arterial elevada (igual ou superior a 130/85 mmHg) e glicémia elevada (igual ou superior a 100 mg/dL) [9].

O Excesso de Peso e a Obesidade são caracterizados por uma acumulação excessiva de gordura prejudicial para a saúde. São diagnosticados em função do Índice de Massa Corporal (IMC), valor que transmite uma relação entre peso e altura. Uma situação de Excesso de Peso é diagnosticada quando o IMC é igual ou superior a 25. Se o IMC for igual ou superior a 30, é diagnosticada Obesidade. Indivíduos com Excesso de Peso ou Obesidade apresentam risco elevado de desenvolvimento de Diabetes e doenças cardiovasculares [1].

A patologia metabólica está associada a uma redução da modulação parasimpática, a nível do coração, e a um aumento do tónus simpático. Esta diminuição da atividade autonómica regista-se, desde logo, numa fase inicial da patologia, evoluindo de uma forma progressiva [20], [54].

Em indivíduos insulicamente resistentes, nomeadamente, pacientes com Diabetes tipo 2, regista-se, caracteristicamente, uma redução na VFC, reflexo de uma alteração nos mecanismos de regulação neural. A neuropatia autonómica está associada a alterações na modulação autonómica do ritmo cardíaco, através do nodo sinoatrial, reduzindo a VFC [55].

Estudos levados a cabo em contexto clínico sugerem que esta disfunção autonómica está comumente associada à Diabetes tipo 1 e à Diabetes tipo 2 e que implica efeitos a nível cardiovascular, nomeadamente no desenvolvimento de doenças como a aterosclerose e o enfarte do miocárdio [15].

Os primeiros sintomas da Diabetes tipo 2 são a intolerância à glicose e a resistência à insulina. Estes fatores aliados acabam por resultar em hiperglicemia, característica típica da doença. De uma forma simplificada, a Diabetes tipo 2 caracteriza-se por uma resistência periférica à insulina, um metabolismo hepático da glicose anormal e falhas progressivas ao nível das células  $\beta$  do pâncreas [6].



# 3

## ESTADO DA ARTE

Em condições normais de regulação fisiológica, é normal que as vias simpática e parassimpática do SNA atuem em simultâneo sobre um mesmo órgão, com efeitos contrários, ou seja, enquanto uma via está ativada a outra estará inibida [48], [32].

Acredita-se que os distúrbios metabólicos, enquanto condições patológicas, têm consequências a nível da regulação pelo SNS e SNP.

A insulina assume um papel de extrema importância em toda a função metabólica [32]. É uma hormona produzida ao nível do pâncreas, a qual é responsável pelo transporte de glicose da corrente sanguínea para as células, onde a glicose é consumida, produzindo energia [2].

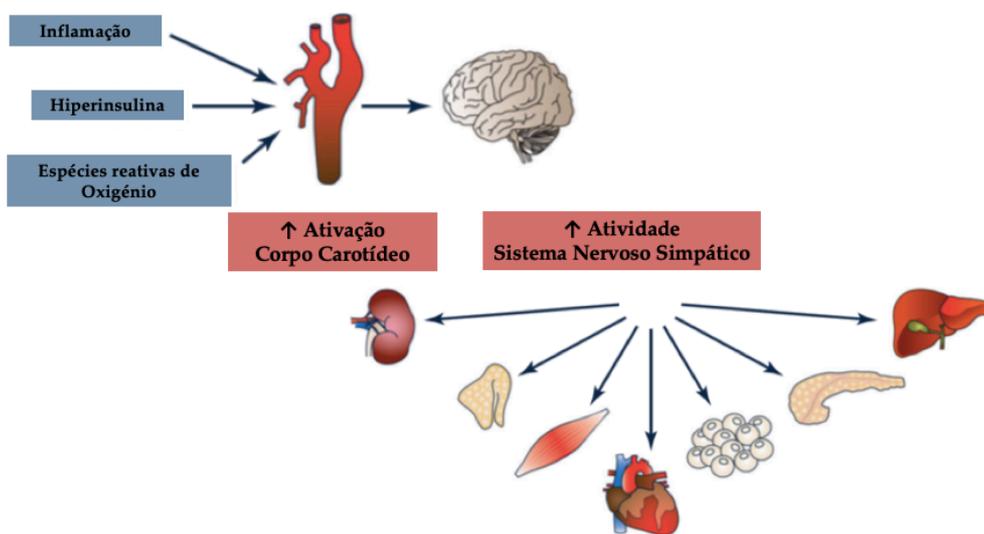
A Diabetes é uma patologia crónica caracterizada por um excesso de glicose no sangue, consequência de um défice de produção de uma hormona, a insulina, ou por uma incapacidade de utilização adequada desta hormona [2].

Atualmente, a Diabetes é diagnosticada em três grandes variantes: Diabetes tipo 1, Diabetes tipo 2 e Diabetes gestacional, sendo que esta última afeta apenas mulheres grávidas. A Diabetes tipo 1 tem origem numa reação autoimune onde o corpo afeta as células produtoras de insulina. A Diabetes tipo 2 caracteriza-se por uma inadequada produção de insulina ou uma incapacidade do corpo responder adequadamente à ação da insulina [2].

Estudos recentes sugerem que o CC pode estar implicado em doenças do foro metabólico, na patogénese de condições metabólicas crónicas, como é o caso da Diabetes tipo 2 [11], [5].

Dietas hipercalóricas implicam o aumento da segregação de insulina pelo pâncreas, levando a um incremento dos níveis desta hormona no sangue, o que

representa um fator de ativação do CC. Este tipo de dieta, ao aumentar a atividade do CC, estimula o SNS. Esta hiperestimulação do SNS é notória pela análise do espectro de potências de sinais de VFC [11]. A Figura 14 ilustra as relações entre situações estimulativas do CC e a atuação do SNS em vários órgãos efetores.



**Figura 14.** – Esquemático dos órgãos efetores do SNS, sendo a estimulação do SNS originada pela ativação dos recetores do CC.

Adaptado de [5].

Vários estudos têm refletido as implicações do CC e da sua total ou parcial remoção na atividade cardíaca e na pressão arterial, consequências modeladas pelo SNS.

Foi observado que a remoção cirúrgica do NSC previne o desenvolvimento de sintomas de resistência à insulina em modelos animais de ratos submetidos a dietas hipercalóricas [11]. Reforça-se, então, que o CC pode ter influência na origem de doença metabólica.

A ressecção cirúrgica do NSC leva a uma diminuição da estimulação do SNS, retrocedendo as condições patológicas metabólicas, sugerindo um retorno à atividade basal do SNS [11]. Assim, o bloqueio cirúrgico do NSC poderá apresentar-se como uma terapêutica inovadora para indivíduos com Diabetes tipo 2 em estado inicial ou para aqueles em que a medicação convencional não tem os resultados desejados.

As células responsáveis pela produção de insulina, presentes no pâncreas, são inervadas por nervos de origem simpática e parassimpática, mostrando a

possível relação direta entre estas células e o nervo sensitivo do CC. A ativação do SNS está associada a uma redução da secreção de insulina [32].

É consensual, na comunidade científica, que o SNS tem um papel importante na origem de disfunções metabólicas, como a obesidade ou a Diabetes tipo 2. Estas alterações metabólicas patológicas têm repercussões ao nível do sistema cardiovascular. No entanto, a forma como o SNS e o SNP são afetados por estas condições e a forma como estes influenciam o sistema cardiovascular e a atividade cardíaca permanece por esclarecer, pela impossibilidade de se aceder diretamente ao SNA. Assim, um estudo da VFC em condições de patologia metabólica, neste caso, de resistência à insulina, torna-se essencial para poder concluir sobre a atividade do SNA nestas circunstâncias.

As doenças metabólicas são tipicamente excitatórias do SNS, promovendo uma hiperestimulação deste sistema [5]. Estas condições estão associadas a um decréscimo da atividade regulatória pelo SNP sem um efeito compensatório inibidor da regulação simpática [48]. No entanto, a forma como tal ocorre e as consequências cardíacas e vasculares destas alterações nervosas permanecem por esclarecer.

Várias terapêuticas de reversão de patologia metabólica têm vindo a ser estudadas ao longo dos últimos anos e algumas delas têm sido postas em prática. A cirurgia bariátrica, vulgarmente conhecida como redução do estômago, representou o primeiro indício de que a Diabetes poderia ser reversível, resultando numa normalização dos níveis de glicose no sangue e diminuição de massa gorda. No entanto, os resultados apresentados permaneceram aquém dos de outros tratamentos, como a medicação intensiva [56].

Anteriormente, o grupo da professora Sílvia Conde descreveu que a abolição do CC, por resseção cirúrgica do NSC, restaura a resistência à insulina e a tolerância à glicose. Esta restauração das características metabólicas está relacionada com a recuperação da sinalização insulínica em tecidos sensíveis à insulina e com uma melhor captação de glicose pelo fígado. Foi, então, testada a hipótese de que a inibição da atividade do NSC, por resseção bilateral deste nervo sensitivo, representa uma terapêutica viável no controlo da Diabetes tipo 2. No entanto, a resseção deste nervo tem associados efeitos secundários relevantes, influenciando a resposta à hipoxia, a sensibilidade ao CO<sub>2</sub>, flutuações na pressão arterial, entre outros [6].



# 4

## MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento experimental e a metodologia adotada são tais que permitem a aquisição de variados parâmetros cardiovasculares, nomeadamente, de pressão arterial e de ritmo cardíaco, com principal destaque para os valores de VFC.

Uma análise da VFC permitirá compreender sobre a atividade das vias simpática e parassimpática do SNA.

Não foram adquiridos dados específicos para este projeto. O projeto consiste especificamente em, com os dados previamente recolhidos pelo grupo, estudá-los no sentido de averiguar conclusões que deles advenham, de comparação entre animais saudáveis e com resistência insulínica, bem como, em animais sujeitos a resseção cirúrgica do NSC. Trata-se, portanto, de um estudo prospetivo.

Os dados experimentais tratados nesta dissertação foram antecipadamente adquiridos pelo grupo da professora Sílvia Conde, no Laboratório de Controlo Neuronal dos Distúrbios Metabólicos, no Centro de Investigação de Doenças Crónicas (CEDOC).

Assim, todo o processamento, análise e interpretação foi adaptado aos dados disponibilizados.

Neste capítulo, a forma como os dados são adquiridos, bem como o procedimento para análise dos dados, serão descritos pormenorizadamente.

## 4.1. Modelos animais e aquisição dos dados experimentais

Os dados foram previamente adquiridos em ratos Wistar machos obtidos do biotério da NOVA Medical School, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal. Os animais foram mantidos numa condição de temperatura e humidade controladas ( $21 \pm 1$  °C;  $55 \pm 10\%$  humidade) com um ciclo de 12 h de luz/ 12 h de escuro e com *ad libitum* acesso a água e comida.

Os procedimentos laboratoriais foram realizados de acordo com a legislação da União Europeia para proteção de vertebrados utilizados em experiências e outros fins científicos (Diretiva 2010/63/EU) e aprovados pela Comissão de Ética da Nova Medical School/Faculdade de Ciências Médicas.

Os dados foram adquiridos em modelos animais patológicos, em estado pré-diabético e com Diabetes tipo 2, com o nervo do seio carotídeo intacto; em modelos de ratos com denervação bilateral do NSC e em modelos animais saudáveis. O grupo sem patologia representa o grupo de controlo. Os grupos portadores de patologia são resultado de duas dietas hipercalóricas distintas, resultando em estadios diferentes de patologia metabólica.

Foram considerados 5 grupos distintos de animais: Controlo, HFat, HFHSu, Controlo DEN e HFat DEN. As denominações dizem respeito à dieta a que os animais foram submetidos e à denervação, ou não, do NSC.

O grupo Controlo é composto por animais de idades compreendidas entre 19 e 25 semanas, controlo *age-matched*, submetidos a uma dieta *standard* (7,4% lípidos e 75% carbohidratos, dos quais 4% açúcares e 17,6% proteína). São animais, à partida, saudáveis, sem excesso de peso.

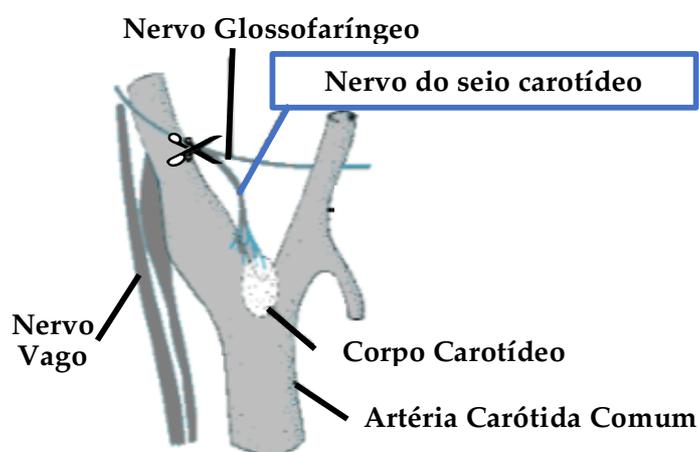
O grupo HFat é constituído por ratos com 27 semanas (8 semanas submetidos a uma dieta *standard* + 19 semanas em dieta hipercalórica). A dieta *High Fat* (HFat) caracteriza-se por um consumo excessivo de gordura (61,6% de gordura + 20,3% de carbohidratos + 19,1% de proteína). Os animais deste grupo não são diabéticos, mas podem ser um modelo de distúrbio metabólico, como a obesidade e/ou um estado de pré-diabetes e/ou síndrome metabólico.

O grupo HFHSu é formado por animais com 33 semanas de idade (8 semanas submetidos a uma dieta *standard* + 25 semanas em dieta hipercalórica). A dieta *High Fat High Sucrose* (HFHSu) consiste numa dieta rica em gordura e com consumo aumentado de açúcar (61,6% gordura + 20,3% carbohidratos + 19,1%

proteína + 35% peso/volume sacarose). Os animais deste grupo são diabéticos, portadores de Diabetes tipo 2.

Para uma composição detalhada das dietas apresentadas, deve ser consultado o anexo I, onde são apresentadas as tabelas com todas as precisões das várias dietas implementadas.

O sufixo DEN (do inglês, *denervation*) diz respeito à ressecção cirúrgica do NSC. Assim, os grupos Controlo DEN e HFat DEN são animais controlo e HFat, respetivamente, submetidos a denervação do nervo do seio carotídeo. Na Figura 15 é ilustrado o local deste bloqueio cirúrgico.



**Figura 15.** – Secção dos nervos do seio carotídeo. Representação diagramática do local de ressecção do NSC.

Adaptado de [58]. O local da secção está indicado com o símbolo da tesoura.

Os animais de cada grupo apresentam, entre si, características metabólicas semelhantes, massa corporal semelhante e, portanto, o mesmo estado de patologia.

A sensibilidade à insulina, a tolerância à glicose, o peso corporal e a ingestão de líquidos e energia foram monitorizados ao longo de todo o período experimental, alguns com medições diárias. Perante as características obtidas nestes testes, os ratos foram classificados como modelos de diferentes patologias. Neste seguimento, na Tabela 1, é apresentada, de uma forma sucinta, a informação mais relevante sobre os vários grupos de animais.

**Tabela 1.** – Esquematização da informação sobre os vários grupos de animais em estudo.

	<b>Dieta</b>	<b>Patologia</b>	<b>Idade</b>
<b>Controlo</b>	<i>Standard</i>	–	<i>age-matched</i>
<b>HFat</b>	<i>High Fat</i>	Síndrome Metabólico Pré-Diabetes	27 semanas
<b>HFHSu</b>	<i>High Fat High Sucrose</i>	Síndrome Metabólico Diabetes tipo 2	33 semanas
<b>Controlo DEN</b>	<i>Standard</i>	–	<i>age-matched</i>
<b>HFat DEN</b>	<i>High Fat</i>	Síndrome Metabólico Pré-Diabetes	33 semanas

Os ratos foram submetidos a um ensaio terminal no qual foram anestesiados com pentobarbital sódico (60 g/kg), sendo cateterizada a artéria femoral para medição de pressão sanguínea arterial, através de um transdutor de pressão (EMKA Technologies, Paris, França). Foram adquiridos sinais de pressão sanguínea ao longo do tempo. A partir deste sinal, foram calculados valores relevantes de pressão sanguínea, que permitem concluir sobre características vasculares e circulatórias. A curva de pressão arterial média (PAM) é derivada e obtém-se o ritmo cardíaco. A identificação do pico da PAM permite identificar as ondas R e assim obter os intervalos RR.

Para além da cateterização da artéria femoral, foi também cateterizada a veia femoral, para administração de fármacos como anestesia e dos estímulos, como a glicose (0.75 mg/kg). Foi colocada também uma cânula na traqueia dos animais, para possibilitar a ventilação espontânea no decurso do procedimento experimental. Os animais foram mantidos numa manta, por forma a garantir a manutenção da temperatura corporal, evitando grandes oscilações desta. Esta temperatura será entre os 36°C e os 37°C.

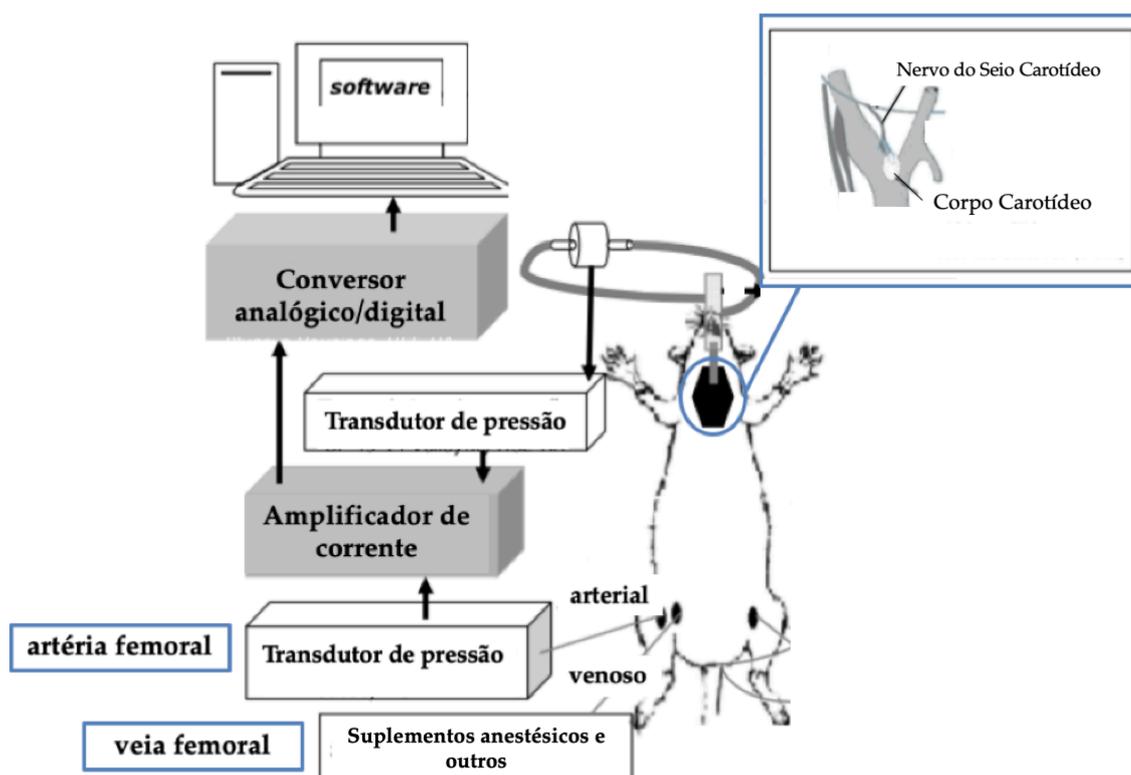
A aquisição foi realizada através de um microcomputador equipado com um conversor analógico-digital.

Na Figura 16 apresenta-se, de forma esquemática, o método adotado para aquisição de dados.

Os valores de PAM são calculados partindo dos valores da pressão sanguínea sistólica (PS) e diastólica (PD), através do *software* Iox 2.9.5.73 da Emka Technologies (Paris, França) [57]:

$$PAM = \frac{PS + 2 \times PD}{3} \quad (4.1)$$

Os intervalos RR são obtidos pelo mesmo *software*, com uma frequência de aquisição de 500 Hz [57]. Como resultado do processamento efetuado pelo *software*, obtém-se um ficheiro contendo os intervalos RR (em milissegundos), ou o seu valor médio, para cada batimento cardíaco ou para cada intervalo temporal pretendido, respetivamente. Os dados adquiridos foram analisados numa formação com base em batimento-a-batimento.



**Figura 16.** – Esquema da aquisição e análise de dados, com referência à estrutura anatómica e localização do CC.  
Adaptado de [58].

No presente estudo são analisadas séries de intervalos RR numa situação basal para os vários grupos de animais. Esta análise é realizada em intervalos temporais entre 4 a 16 minutos. Pretende-se, assim, perceber o impacto de diferentes dietas, algumas potenciadoras de patologia metabólica, na VFC e, consequentemente, no SNA.

Alguns dos parâmetros em estudo são sensíveis à dimensão do sinal, ou seja, ao tempo de aquisição considerado para a análise. Posto isto, surge a necessidade de garantir que todos os sinais em estudo, dos vários grupos de animais, são invariáveis em tamanho, isto é, que os sinais em estudo correspondam todos a um igual intervalo temporal de aquisição.

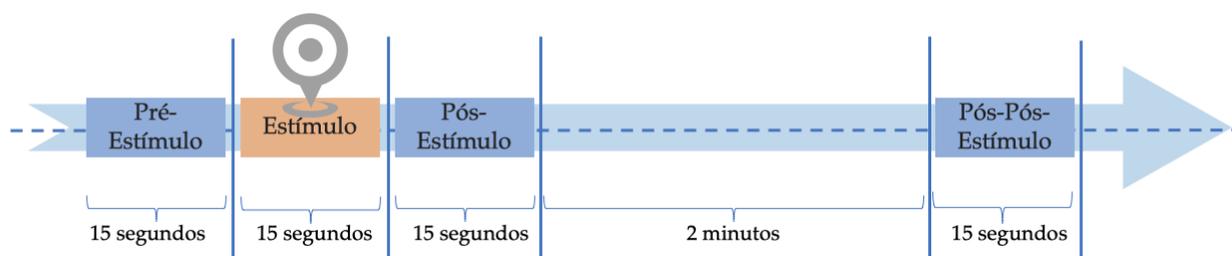
Para a seleção do melhor intervalo de tempo da aquisição a analisar, vários fatores foram tidos em conta. Procedeu-se à segmentação dos sinais adquiridos em intervalos de 8 minutos (o maior intervalo comum a todas as aquisições). Após esta divisão, os sinais foram analisados visualmente, na procura de um sinal estacionário. Para uma avaliação mais detalhada desta estacionaridade, estes segmentos de 8 minutos foram subdivididos e parâmetros estatísticos (média e variância) foram calculados, assumindo-se que um intervalo temporal que mantem estes parâmetros na mesma ordem de grandeza é um intervalo estável. Apesar deste procedimento poder ter tendência a selecionar intervalos com menor variação de parâmetros estatísticos e, portanto, poder influenciar os resultados obtidos, a aplicação do mesmo procedimento aos vários grupos de animais torna-os comparáveis e valida os resultados. Toda esta análise foi conseguida com recurso ao *software MatLab*. Uma vez encontrado o intervalo de 8 minutos mais adequado, procedeu-se à restante análise.

À medida que o período de monitorização reduz, o parâmetro SDNN refere-se a intervalos de menor comprimento. Para além disso, a variância total da VFC tende a aumentar com o aumento do comprimento da aquisição em análise. Assim, na prática, é inapropriado comparar valores de SDNN de aquisições de sinais de durações diferentes. Intervalos de aquisição de sinais de cerca de 5 minutos são considerados, na literatura, adequados para extração de informação sobre os vários parâmetros [59].

O efeito de diferentes estímulos sobre a VFC é estudado através da análise de séries temporais de intervalos RR em situação de estímulo metabólico e não metabólico, em animais sujeitos a uma dieta controlo e a uma dieta rica em gordura e sacarose (HFHSu).

Primeiro, é estudado o efeito da exposição dos animais a um período de 15 segundos de anoxia. Este estímulo é conseguido pela privação dos animais de oxigénio, através da oclusão da cânula colocada na traqueia do animal, durante um período de 15 segundos.

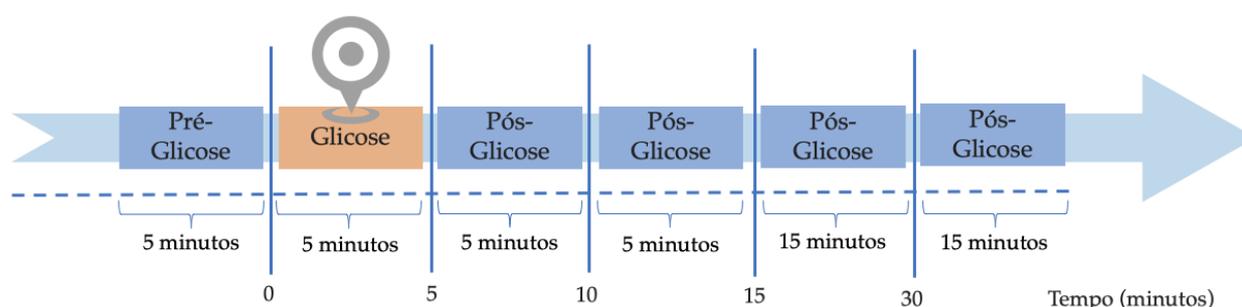
Aqui são analisados excertos da série de RR, a saber: 15 segundos antes do estímulo; 15 segundos aquando do estímulo; 15 segundos após o estímulo e 15 segundos quando passados 2 minutos do fim do estímulo. Logo, para um estudo do impacto do estímulo de anoxia, são considerados quatro intervalos temporais distintos de valores de RR, comparando-os entre eles e percebendo o seu perfil de variação, para os dois grupos de animais em análise. Na Figura 17 é apresentado um cronograma com explicação dos intervalos de RR em análise para este estímulo.



**Figura 17.** – Cronograma da análise de segmentos temporais de séries de intervalos RR para estudo do impacto de uma condição de anoxia.

Estudo do impacto de uma condição de estímulo não metabólico – anoxia – no sistema nervoso autônomo de roedores saudáveis e de roedores com patologia metabólica.

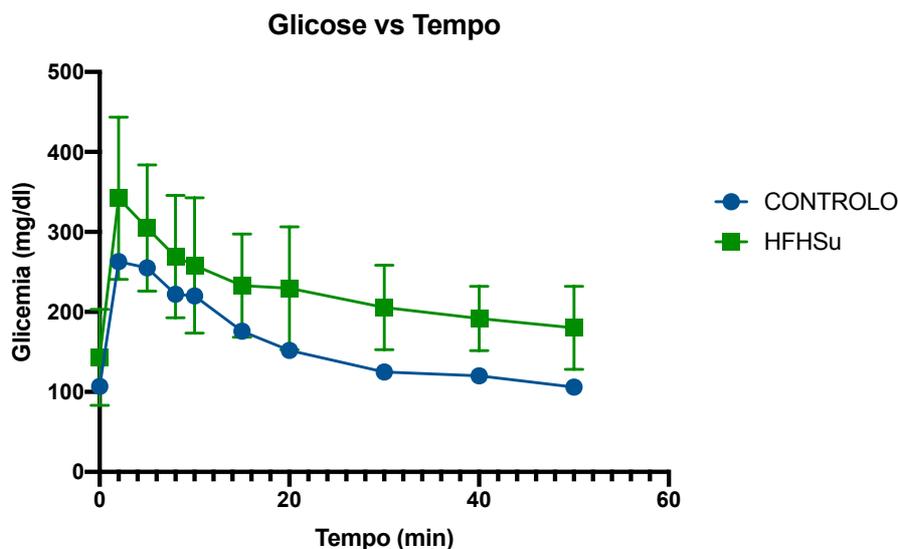
Em segundo lugar, é avaliado o efeito do aumento dos níveis de glicose no sangue, avaliando o impacto de um estímulo de glicose na VFC. São analisados segmentos da série de intervalos RR antes, durante e após exposição a este estímulo metabólico: 5 minutos antes do estímulo; 5 minutos no momento do estímulo; 5 minutos imediatamente após o estímulo; 5 minutos depois; 15 minutos seguintes e outro intervalo de 15 minutos. São, então, estudados 6 intervalos temporais distintos de valores de RR, comparando-os entre eles e percebendo o seu perfil de variação, para os dois grupos de animais em análise. Estes intervalos são apresentados de forma esquemática na Figura 18.



**Figura 18.** – Cronograma da análise de segmentos temporais de séries de intervalos RR para estudo do impacto de um aumento da concentração de glicose no sangue.

Estudo do impacto de uma condição de estímulo metabólico – glicose – no sistema nervoso autônomo de roedores saudáveis e de roedores com patologia metabólica.

A escolha dos segmentos temporais a analisar aquando de um estímulo de glicose, ou seja, um rápido aumento dos níveis de glicose no sangue, prendeu-se com a análise do comportamento dos valores de glicémia ao longo do tempo. Na Figura 19 ilustra-se a evolução da curva de glicémia em função do tempo decorrido, em minutos, após o estímulo.



**Figura 19.** – Gráfico representativo das curvas de excursão de Glicose administrada por via intravenosa (0,75 mg/kg) ao longo do tempo (em minutos).

Em animais controlo (n=1) e em animais com patologia metabólica (HFHSu, n=3). O momento 0 minutos corresponde à medição da glicemia imediatamente antes da administração intravenosa de Glicose.

Este estímulo é conseguido pela injeção, por via venosa, de glicose numa concentração de 0,75 g/kg.

#### 4.1.1. Atividade cardíaca em modelos animais de ratos Wistar

A atividade cardíaca de modelos de animais de ratos Wistar é um tópico que não reúne consenso na comunidade científica. Critérios que permitam distinguir e caracterizar alterações mais ou menos significativas no registo eletrocardiográfico destes animais não estão estabelecidos. Estes factos devem-se, essencialmente, a um baixo número de estudos experimentais neste seguimento, bem como a uma grande heterogeneidade entre estudos. Variáveis como a idade e outras condições fisiológicas dos animais, ou a anestesia utilizada no procedimento experimental, alteram os resultados e tornam-nos suscetíveis de variações [60], [61].

Para um rato Wistar saudável, a frequência cardíaca tipicamente encontra-se em valores entre os 242 e os 452 bpm [60]. No que concerne à VFC, os mamíferos, em repouso, têm uma ampla distribuição dos valores dos intervalos RR. Para um humano, estes valores situam-se entre os 600 e os 1000 milissegundos. Para um rato Wistar em idade adulta, estes valores serão na ordem dos 118 a 251

milissegundos, consequência de um ritmo cardíaco superior, ou seja, de um valor maior de FC [60].

Os valores tidos como referência para a atividade cardíaca dos modelos animais utilizados foram essenciais na definição da estruturação da interface e nos métodos de análise da VFC.

Numa fase inicial, confirmou-se se todos os sinais em estudo se encontravam dentro dos valores de referência, excluindo-se possíveis animais com outra patologia, como cardiovascular, que pudesse apresentar resultados díspares e incomparáveis com os restantes roedores em estudo.

Em condições de anestesia, os valores apresentados são afetados e surgem outros valores padrão, dependentes do tipo de anestesia utilizada [61].

#### **4.1.2. Efeitos da anestesia Pentobarbital Sódico no rato Wistar**

O rato Wistar é um animal frequentemente utilizado em investigação médica, no entanto, a influência dos anestésicos na hemodinâmica deste animal é relativamente pouco conhecida e explorada. As informações disponíveis são escassas e restritas a observações sobre a pressão arterial e, eventualmente, sobre débito cardíaco [61].

A injeção intravenosa de pentobarbital de sódio provoca uma redução na pressão arterial do rato, notada nos 5 minutos imediatos à injeção. Tende a variar de um valor médio de 105 mmHg para um mínimo de 75 mmHg. Passados 30 minutos após a anestesia, a pressão arterial é restaurada para um valor médio de 90 mmHg. A frequência cardíaca aumenta ligeiramente com esta anestesia [61].

A nível metabólico, a anestesia com recurso a pentobarbital de sódio parece não afetar os parâmetros metabólicos, nomeadamente, tolerância à glicose e resistência à insulina. A administração de pentobarbital sódico não altera o nível de glicose ao longo de um período de até 30 minutos após a injeção da anestesia [62].

Assim, este tipo de anestesia será indicado para procedimentos experimentais que pretendem aferir sobre condições metabólicas, por garantir uma manutenção dos parâmetros de caracterização do metabolismo.

## 4.2. Processamento dos dados – Interface desenvolvida em MatLab para análise da VFC

Os dados adquiridos são automaticamente processados pelo *software* disponível no laboratório. Como resultado obtêm-se os valores da duração dos intervalos RR ao longo do tempo das várias aquisições.

Para análise da VFC são utilizados métodos tradicionais de análise no domínio do tempo e da frequência, com recurso a transformada de Fourier (poder-se-ia, de igual modo, ter optado pela transformada discreta de *wavelets* ou a transformada de Hilbert-Huang). O comportamento dinâmico do sinal da VFC também é analisado, por métodos não lineares.

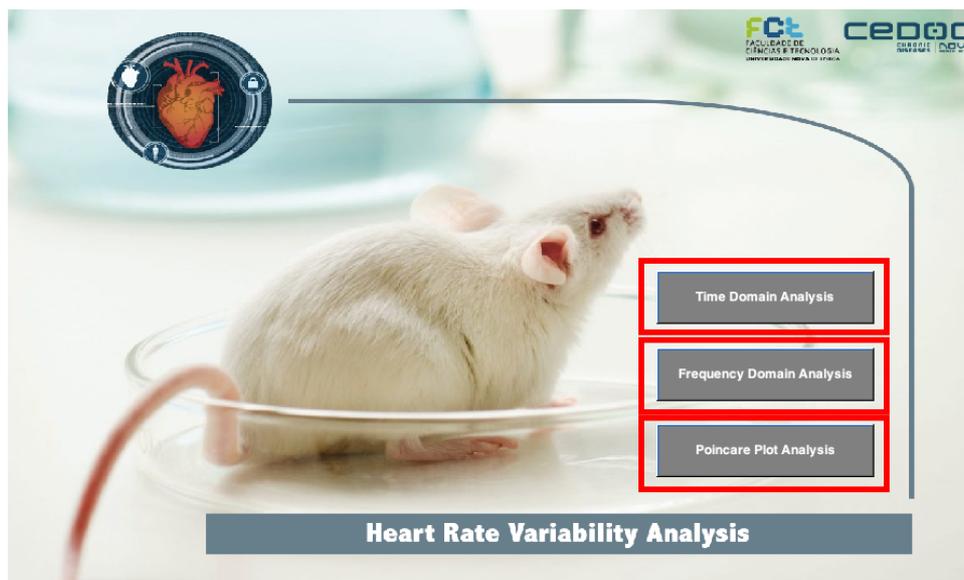
Para a análise dos dados adquiridos foram utilizados os modelos de interface *HRV* e *Freq\_dom*, construídos pelos Mestres Filipe Valadas [63] e Sofia Silvestre [64], respetivamente, com recurso ao módulo logicial ©*Matlab R2012b* [80]. Estas interfaces foram construídas através da ferramenta *GUIDE* do *Matlab*.

Os modelos de interface mencionados em epígrafe foram idealizados para análise de VFC no homem, com uma finalidade distinta da proposta neste projeto. Assim, várias alterações e adequações foram realizadas, no sentido de tornar esta interface adaptada para a aplicação em modelos animais de ratos, bem como para as circunstâncias específicas de aquisição de dados e condições patológicas dos animais em estudo.

A interface foi idealizada e desenvolvida em 3 módulos independentes: análise no domínio do tempo, análise no domínio da frequência e análise das formas de dispersão dos gráficos de Poincaré. O módulo para análise dos gráficos de Poincaré foi desenvolvido de raiz para o presente estudo, também, com recurso à ferramenta *GUIDE* do *Matlab*.

A página inicial da interface permite o acesso, através de botões interativos, a cada um dos módulos mencionados. Na Figura 20 é apresentada a página inicial. Cada um dos botões exibidos permite o acesso ao respetivo módulo.

Ao longo deste capítulo, serão apresentadas e descritas todas as funcionalidades da interface desenvolvida.



**Figura 20.** – Página inicial da interface desenvolvida em Matlab.

As funcionalidades encontram-se destacadas: a vermelho, observam-se os botões que permitem o acesso a cada um dos módulos constituintes da interface.

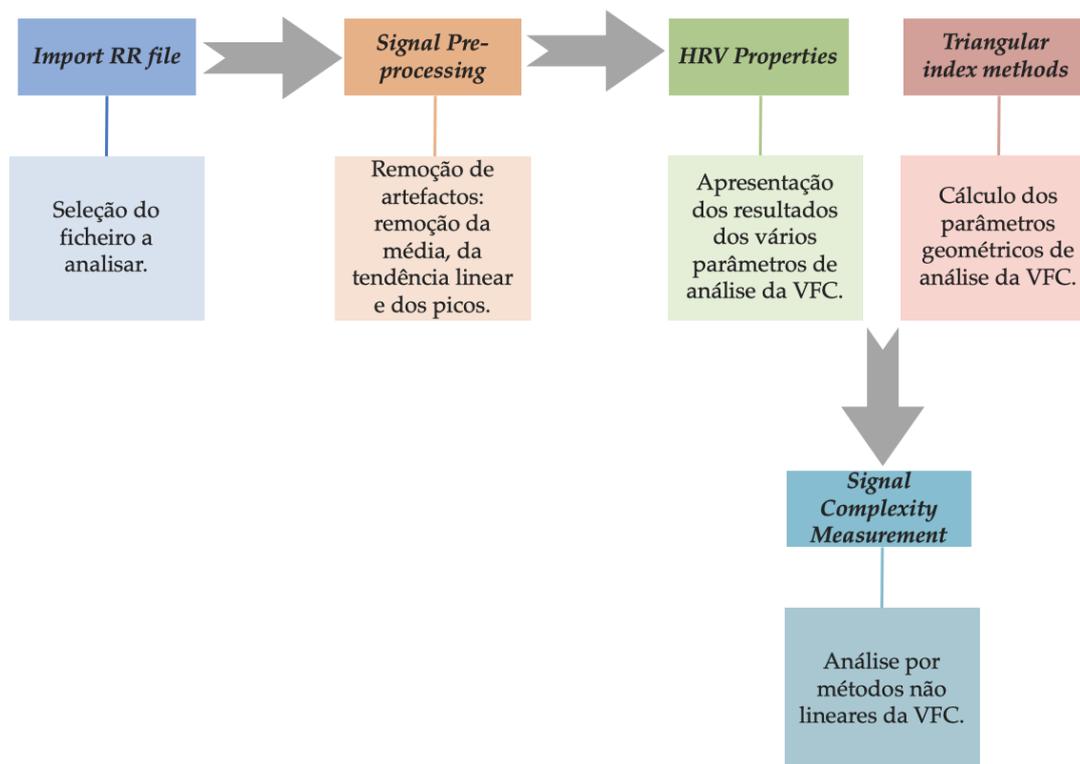
### 4.2.1. Análise da VFC no domínio do tempo

Os vários módulos constituintes da interface foram idealizados de forma a funcionarem como entidades independentes. Assim, o utilizador pode optar por uma análise da VFC em todos os domínios disponíveis, ou apenas num deles.

O módulo destinado à análise no domínio do tempo permite analisar graficamente a série de RR, remover artefactos e obter diversos parâmetros caracterizadores da série. A interface funciona de uma forma sequencial, sendo que as várias secções vão ficando acessíveis ao utilizador de uma forma progressiva. A sequência de funcionamento deste módulo é apresentada, sucintamente, na Figura 21.

O primeiro passo é a seleção do ficheiro de intervalos RR pretendido, o qual se deseja analisar. É disponibilizado um botão *Import RR file* que acede aos vários ficheiros e permite ao utilizador a seleção do ficheiro pretendido. A interface foi idealizada para receber um ficheiro com uma coluna única de valores, correspondentes à série temporal de intervalos RR, em formato de texto ASCII (.txt).

Após a validação deste passo, torna-se acessível a secção destinada ao pré-processamento do sinal de intervalos RR. Todas as outras secções permanecem, tal como inicialmente, bloqueadas e inacessíveis ao utilizador. As secções vão sendo desbloqueadas à medida que se cumprem os pré-requisitos de cada uma, obrigando o utilizador a seguir uma ordem específica.

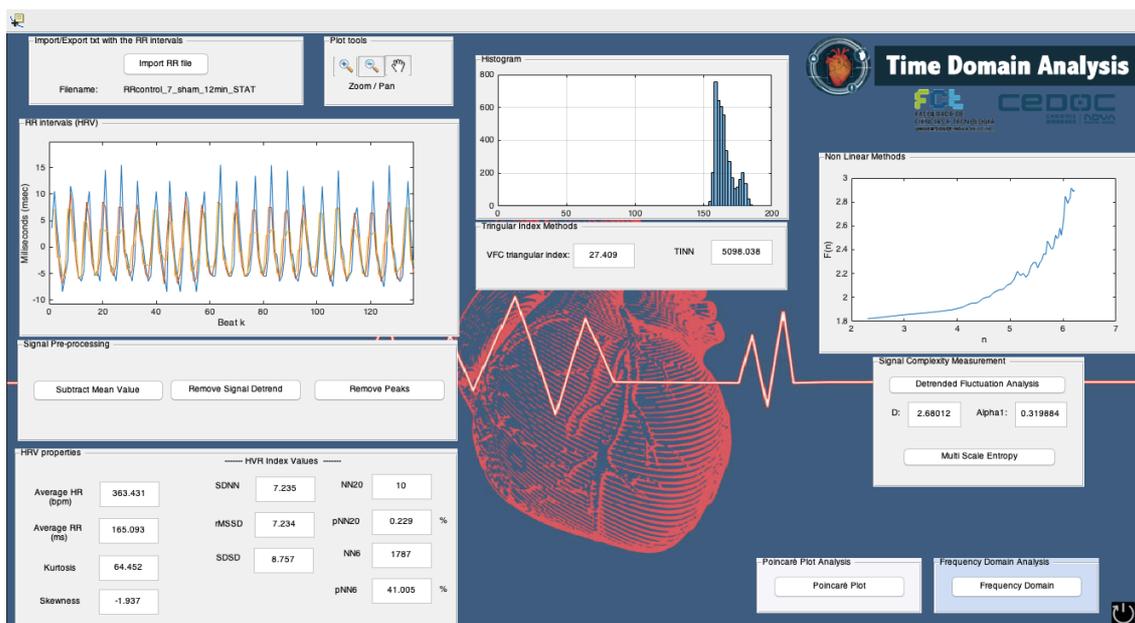


**Figura 21.** – Fluxograma das funcionalidades do módulo da interface destinado a análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo.

Apresentação sequencial das várias secções da interface, acompanhada de uma breve descrição das funcionalidades disponíveis em cada uma das secções. As setas indicam a sucessão de acessibilidade das várias secções, ou seja, a secção seguinte apenas fica disponível ao utilizador após concluída a secção anterior.

A utilização de variáveis globais entre diferentes *GUIDES*, ou seja, entre os diferentes módulos da interface, pode gerar alguma confusão no funcionamento do *software* e dificultar o processo de *debugging*. Assim, aquando da apresentação de cada um dos módulos da interface, o utilizador deverá voltar a seleccionar o ficheiro que pretende analisar (contendo os respetivos intervalos RR), por forma a tornar esta variável global no *GUIDE* em utilização, mas não com passagem automática entre os módulos. Esta é uma forma de código mais limpo e funcional, possibilitando uma programação mais *clean*. Apesar de tornar a interface menos *user-friendly* para o caso de o utilizador pretender uma análise nos vários domínios de uma única série de intervalos RR, tem a vantagem de possibilitar a análise independente entre os vários domínios estudados, o que é essencial para o estudo desenhado no contexto deste projeto.

Na Figura 22 é apresentado o módulo da interface destinado a uma análise das séries temporais de intervalos RR no domínio do tempo.

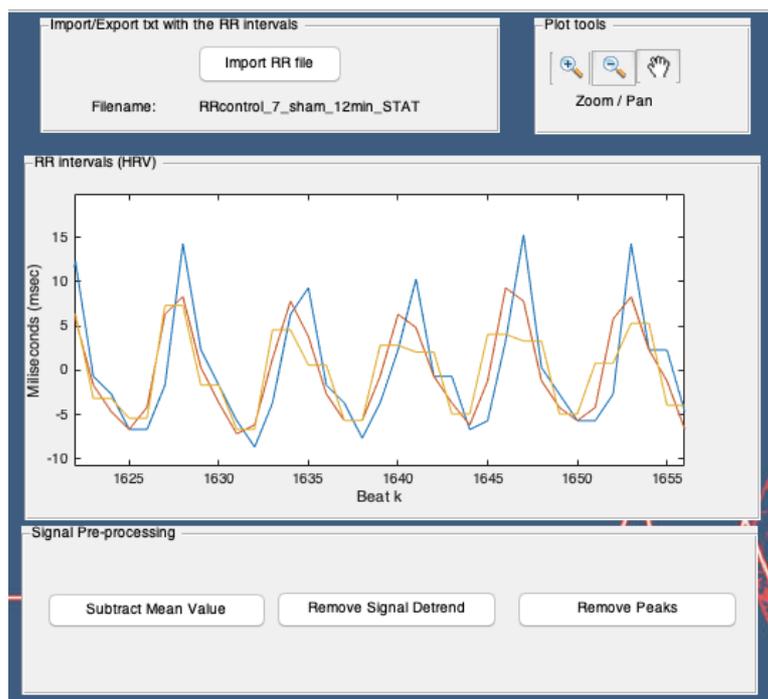


**Figura 22.** – Vista geral do módulo da interface destinado a uma análise do sinal de RR no domínio do tempo.

### Pré-processamento do sinal:

O sinal de RR adquirido é, em primeiro lugar, pré-processado. Este procedimento pretende remover artefactos que possam existir no sinal de RR, quer sejam oriundos de algum tipo de ruído, quer sejam resultado de uma qualquer falha na aquisição, como é o caso da não deteção de algum dos batimentos cardíacos, por exemplo.

Ao consultar o painel da interface designado para o efeito – *Signal Pre-processing* – uma sequência de botões, correspondendo cada um a uma diferente funcionalidade, é disponibilizada. Este conjunto de três botões fornece opções de processamento de sinal – *Substract Mean Value*, *Remove Signal Detrend* e *Remove Peaks*. Na Figura 23 é apresentada a secção específica da interface destinada a este procedimento.

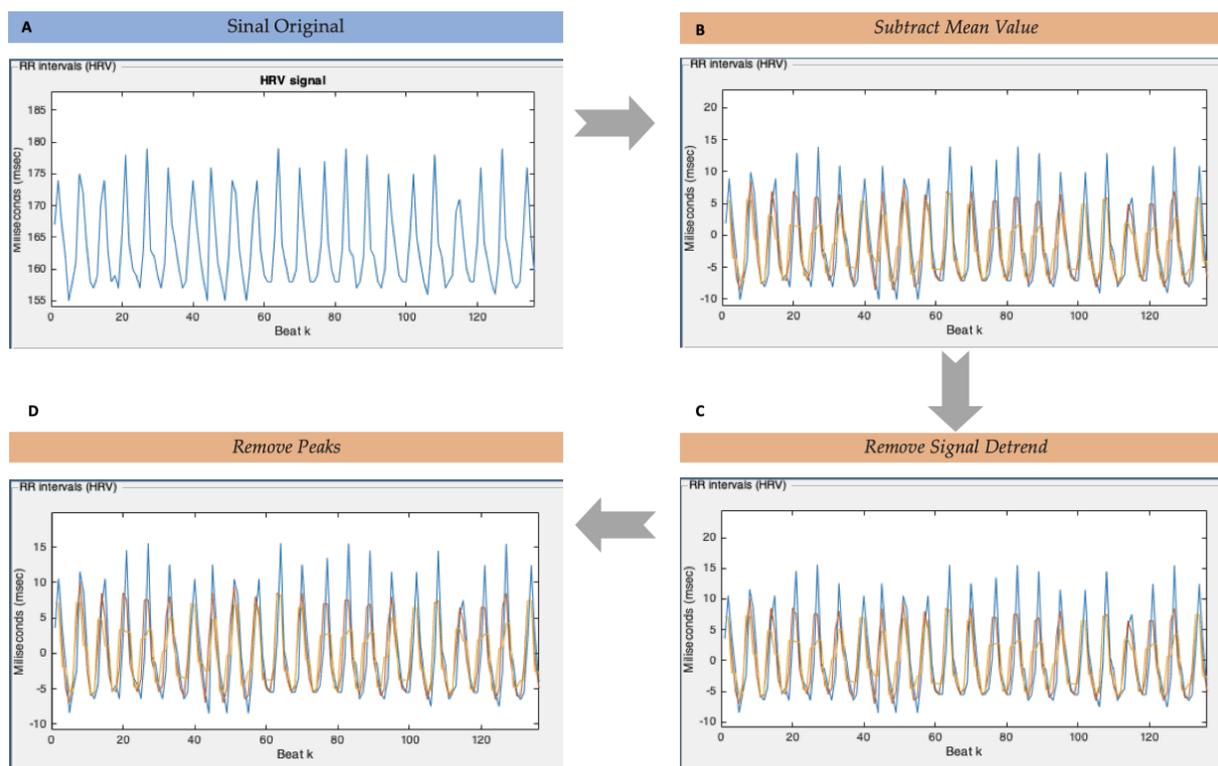


**Figura 23.** – Secção da interface destinada a apresentação do sinal sob a forma gráfica e ao processamento do sinal.

No gráfico representado: a azul o sinal original; a laranja o sinal processado e a vermelho o sinal correspondente à média do sinal original.

O primeiro botão – *Substract Mean Value* – remove o valor da média ao próprio sinal, procurando evitar sobreposições na série temporal e facilitando a interpretação de flutuações no sinal. O segundo botão – *Remove Signal Detrend* – remove ao sinal a sua tendência linear. O terceiro botão – *Remove Peaks* – procura intervalos RR que divirjam da média um valor 3 ou mais vezes o desvio-padrão. Estes intervalos, considerados atípicos, são eliminados.

Este algoritmo, utilizado para processamento do sinal, permite uma remoção de artefactos com resultados bastante satisfatórios e relativamente simples de executar. Na Figura 24 é apresentado o fluxograma que ilustra o pré-processamento a que o sinal é sujeito.



**Figura 24.** – Fluxograma das funcionalidades de processamento do sinal disponibilizadas na seção *Signal Pre-processing* do módulo da interface.

Apresentação sequencial do processamento do sinal para remoção de quaisquer artefactos, tornando o sinal da série temporal de RR apto para uma análise adequada. Em (A) o sinal original, após importação do ficheiro, em (B) o sinal após remoção da média, em (C) o sinal após remoção da média e da tendência linear e em (D) o sinal após remoção da média, da tendência linear e dos picos identificados. As escalas dos gráficos devem ser tidas em consideração.

### **Análise da VFC no domínio do tempo:**

Após o processamento inicial do sinal, obtém-se uma série temporal livre de artefactos. Calculam-se, a partir desta série, os valores de análise da VFC no domínio do tempo. O algoritmo foi desenvolvido no sentido de apresentar, de imediato, os valores de: média, SDNN, rMSSD, SDDSD, NN20 e pNN20, NN6 e pNN6.

Foram analisados, também, índices estatísticos, relacionados com a própria distribuição da série de RR em estudo: *kurtosis* e *skewness*. A *kurtosis* é uma medida de achatamento da curva de distribuição dos dados, tendo como referência uma distribuição normal. A *skewness* mede a assimetria da curva de distribuição em relação, também, a uma distribuição normal.

A *kurtosis* mede a expressividade do pico da distribuição. Um valor absoluto de *kurtosis* superior a 7 é considerado um afastamento substancial da normalidade. Um pico elevado está associado a um valor mais elevado e um pico mais achatado a um valor mais baixo de *kurtosis* [65].

O valor de *skewness* para uma distribuição normal é zero, implicando uma distribuição simétrica. Um valor positivo indica que a cauda do lado direito do gráfico da distribuição é maior que do lado esquerdo, a maioria dos valores encontra-se à esquerda da média. Um valor negativo de *skewness* indica que a cauda no lado esquerdo da distribuição é maior, a maioria dos valores fica no lado direito da média. Tipicamente, é estipulado que um valor absoluto de *skewness* superior a 2 implica uma diferença significativa em relação a uma distribuição normal [65].

Estes parâmetros estatísticos constituem uma forma adicional de caracterizar as séries temporais de intervalos RR em estudo.

A interface está pensada de forma a fornecer, também, informação sobre o ritmo cardíaco. Assim, o número médio de batimentos cardíacos por minuto é calculado tendo por base o valor médio dos intervalos RR. Um batimento cardíaco terá a duração média, em milissegundos, do valor médio de RR. Logo, o número de batimentos cardíacos por minuto (ritmo cardíaco) será o número de batimentos em 60 000 milissegundos, tal como explicado na equação 4.2.

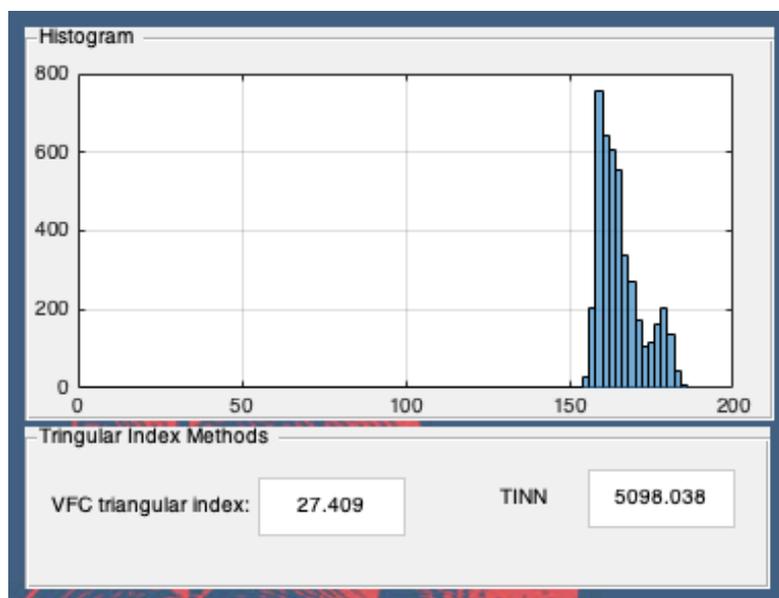
$$\text{HR médio} = \frac{60\ 000}{\text{valor médio de RR}} \quad (4.2)$$

A secção do módulo destinada à apresentação dos valores destes parâmetros é apresenta na Figura 25.



**Figura 25.** – Secção do módulo de análise no domínio do tempo destinada a apresentação dos parâmetros de estudo da série temporal de intervalos RR selecionada.

Este módulo da interface permite, ainda, a recolha de informação de origem geométrica, tendo por base o histograma da série temporal de intervalos RR em análise. Os parâmetros  $T_i$  e TINN são, então, calculados e o seu valor é apresentado ao utilizador, como ilustrado na Figura 26.



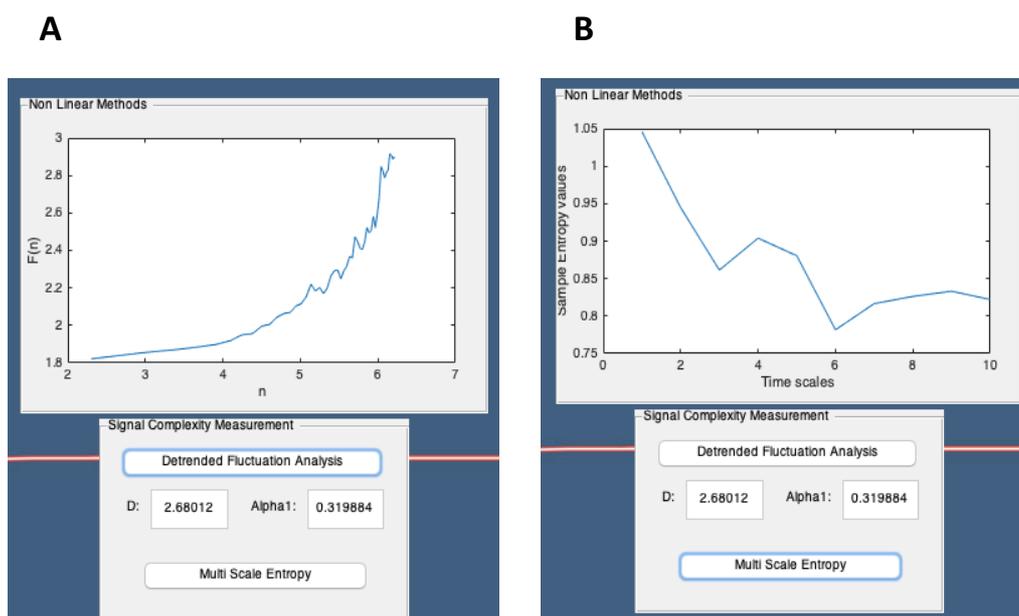
**Figura 26.** – Secção do módulo de análise no domínio do tempo destinada a apresentação dos parâmetros de origem geométrica:  $T_i$  e TINN. Apresentação do histograma da série temporal de intervalos RR em análise.

Alguns parâmetros de cariz não linear são, também, apresentados pela interface. Neste módulo, o utilizador tem acesso aos botões *Detrended Fluctuation Analysis* e *Multi Scale Entropy*. Os resultados de cada um dos botões são apresentados na Figura 27.

Os métodos não lineares perdem significado num contexto de análise de séries de RR de dimensão reduzida, pelo baixo número de pontos disponíveis para uma interpretação fiável.

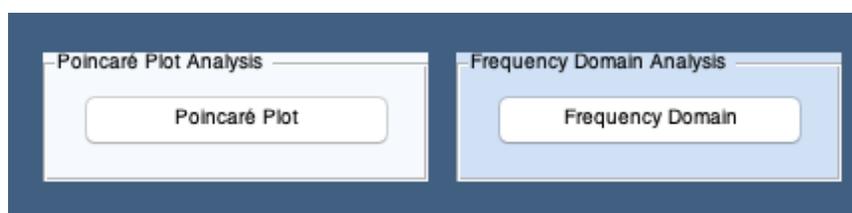
O método *Multi Scale Entropy* exige que seja especificado um número de pontos correspondente à dimensão da série temporal em análise. Assim, para uma análise de séries de dimensões variáveis, acaba por se tornar pouco apelativo. No contexto do problema em estudo, são analisadas séries de dimensões diferentes. Deste modo, este método acabou por não ser considerado.

O método *Detrended Fluctuation Analysis* só tem significado se aplicado a um conjunto razoavelmente elevado de pontos. Assim, só tem significado se aplicado a uma série de intervalos RR com uma dimensão elevada.



**Figura 27.** – Secção do módulo de análise no domínio do tempo destinada a apresentação dos parâmetros resultantes de uma análise não linear. A saber: (A) *Detrended Fluctuation Analysis* e (B) *Multi Scale Entropy*. Os parâmetros D e Alpha 1 são referentes ao método (A).

Este módulo permite, ainda, através de botões, o acesso direto a qualquer um dos outros dois módulos, tal como se mostra na Figura 28.



**Figura 28.** – Botões interativos que permitem o acesso direto a qualquer um dos restantes módulos da interface.

### **Análise da VFC por métodos não lineares no domínio do tempo:**

Nesta secção da interface, são disponibilizadas hipóteses de análise de VFC sob a forma de um método de cariz não linear: estudo dos gráficos de Poincaré.

Com recurso ao *MatLab Software*, módulo logicial ©*Matlab R2015b*, desenvolveu-se uma subinterface capaz de avaliar as diferentes formas e respetivos parâmetros geométricos dos gráficos de dispersões de Poincaré. O código desenvolvido permite avaliar, tendo em conta características morfológicas de qualquer gráfico de Poincaré em estudo, de forma qualitativa e quantitativa. O objetivo foi garantir uma homogeneização da classificação qualitativa dos gráficos, tendo por

base a sua forma visual e aliar essa classificação ao cálculo de parâmetros quantitativos anteriormente descritos – SD1, SD2 e SD1/SD2.

Considerando a classificação qualitativa das dispersões encontradas nos gráficos de Poincaré sugerida por Esterer et al. [41], torna-se essencial a categorização da morfologia do *cluster* central observado, ou seja, a forma do contorno do *cluster* central, bem como o cálculo de parâmetros de origem geométrica: o número de clusters centrais (nCC) e excêntricos (nECC) e o rácio entre o comprimento máximo e a largura máxima do *cluster* central.

Na secção 2.2.1.1.3.A. é feita uma descrição mais pormenorizada dos parâmetros utilizados para a classificação qualitativa dos gráficos de Poincaré. Na figura 8 é apresentada uma representação de cada um dos parâmetros considerados: Lmax, Wmax, CC e ECC.

Tendo conhecimento dos valores destes parâmetros e da forma gerada pelo conjunto de pontos das dispersões de Poincaré, torna-se possível uma classificação morfológica da forma do gráfico produzido. Assim, para esta classificação, foram seguidos os critérios apresentados na Tabela 2.

Este módulo da interface desenvolvida divide-se, essencialmente, em três secções distintas. Na Figura 29 é apresentado este módulo da interface destinado a uma análise qualitativa e quantitativa das dispersões de Poincaré.

A primeira secção, e numa face inicial a única acessível ao utilizador, consiste na importação do ficheiro (.txt) com os valores de RR pretendido. Neste passo, o ficheiro é convertido numa variável do código e automaticamente pré-processado, removendo-se potenciais artefactos. O filtro utilizado é exatamente o mesmo descrito na secção 4.2.1.. Este processo de remoção de artefactos e obtenção de um sinal limpo é executado antes de qualquer análise dos dados em estudo.

Imediatamente após este pré-processamento ser executado com sucesso, é apresentado, ao utilizador, o gráfico de Poincaré dos dados selecionados, bem como os valores dos parâmetros SD1, SD2 e SD12 a ele associados. Estas funcionalidades são ilustradas na Figura 30.

Para conseguir avaliar qualitativamente qual a forma da dispersão de Poincaré apresentada pelo gráfico, o utilizador deve indicar o número de *clusters* centrais e excêntricos que encontra no gráfico; seleccionar, de entre uma lista de formas específicas, a forma do cluster central; identificar no gráfico os dois pontos mais distantes em comprimento e os dois pontos mais distantes em largura e preencher os espaços destinados às suas coordenadas. Por forma a garantir que

eventuais pontos do gráfico de Poincaré demasiado afastados do cluster considerado, que poderão ser *outsiders*, não sejam considerados na análise, cabe ao próprio utilizador a identificação dos pontos mais afastados a considerar para a classificação da dispersão.

O algoritmo calcula a distância entre os pontos, obtendo o comprimento máximo ( $L_{max}$ ) e a largura máxima ( $W_{max}$ ). De seguida, calcula o rácio entre o comprimento máximo e a largura máxima ( $L_{max}/W_{max}$ ).

**Tabela 2.** – Características geométricas das várias morfologias consideradas dos gráficos de Poincaré.

Adaptado de [41].

Forma do Gráfico de Poincaré	$L_{max}/W_{max}^*$	nCC*	nECC*	CC* morfologia
Forma de Cometa	> 1	1	0	Club like
Forma de Torpedo	> 1	1	0	Elíptica
Forma de Leque				
H-Leque	≤ 1	1	0	Triangular
SZ-Leque	≤ 1	1	0	Triangular & SZ*
Padrão de Lóbulo duplo				
Tipo A	~ 1 ou > 1	1	2	Club ou elíptica ou discoide
Tipo B	~ 1 ou > 1	1	2	Club ou elíptica ou discoide
Padrão de Lóbulo triplo				
Tipo A	~ 1 ou > 1	1	3	Club ou elíptica ou discoide
Tipo B	~ 1 ou > 1	1	3	Club ou elíptica ou discoide
Padrão de Ilha				
Tipo A	-	2	2	Discoide
Tipo B	-	3	6	Discoide

\***Observações:**  $L_{max}/W_{max}$  = rácio entre o comprimento máximo e a largura máxima; nCC = número de *clusters* centrais; nECC = número de *clusters* excêntricos; CC = *cluster* central; SZ = silent zone.

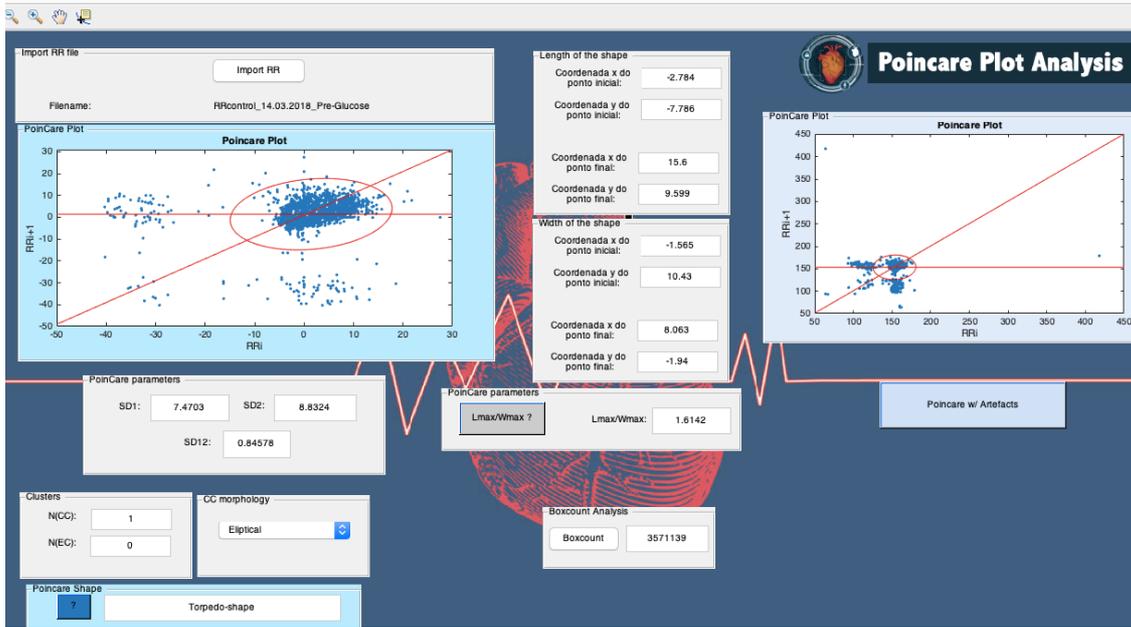


Figura 29. – Vista geral do módulo da interface destinado a uma análise dos Gráficos de Poincaré.

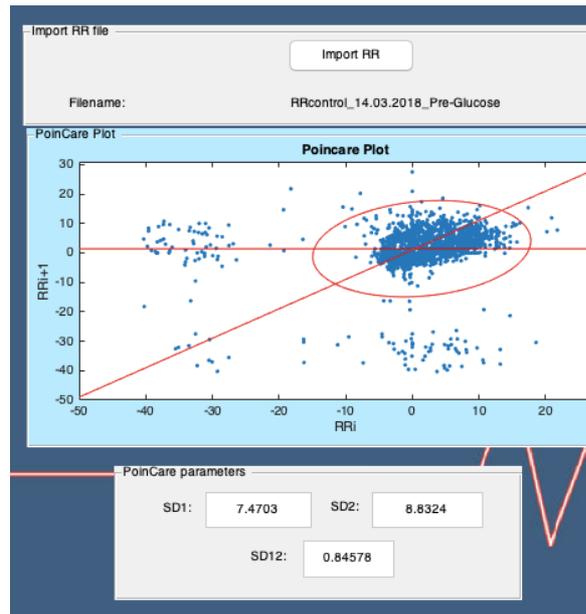


Figura 30. – Secção do módulo destinada a apresentação do gráfico de Poincaré e aos respetivos valores de SD1, SD2 e SD1/SD2.

No gráfico representado: a azul a dispersão de Poincaré do sinal processado; a vermelho a elipse a que o sinal se aproxima e a partir da qual se obtêm os parâmetros mencionados.

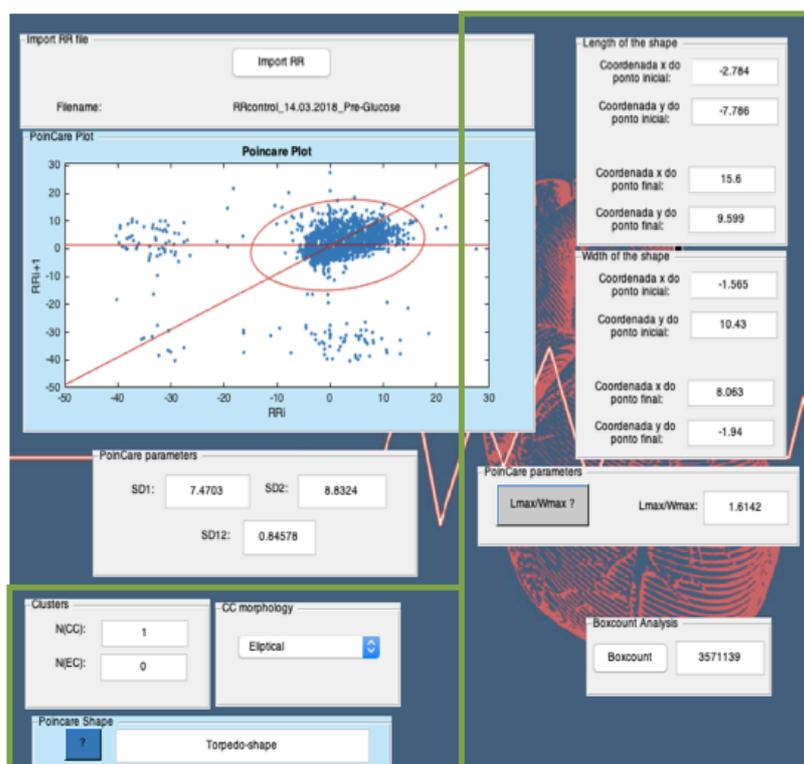
O parâmetro *boxcount* é um estimador de dimensão fractal. É aplicado a conjuntos de pontos bidimensionais. Esta função, numa primeira fase, transforma o gráfico de Poincaré apresentado numa imagem, a qual é binarizada e processada. Esse processamento consiste em cobrir o conjunto de pontos com

uma malha de células com um diâmetro  $d$ , tal que será suficiente para cobrir toda a área ocupada pelos pontos. Em cada iteração desta função, o diâmetro da malha diminui e é contabilizado o número de células ocupadas por pontos,  $N(d)$ .

Na interface desenvolvida, é apresentado o índice  $N(1)$ , que corresponde ao número de células necessárias para cobrir todos os pontos do gráfico de Poincaré, na menor escala. Este resultado permite avaliar a área de ocupação da dispersão da série temporal de intervalos RR.

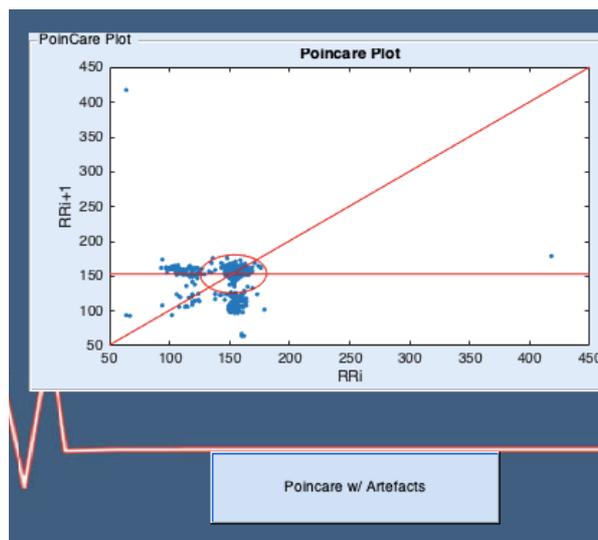
Na Figura 31 é ilustrada a secção que permite, através dos *inputs* do utilizador mencionados em epígrafe, obter os índices  $L_{max}/W_{max}$  e *boxcount*.

Por forma a verificar a remoção de artefactos e/ou tratamento do sinal executado no pré-processamento, o utilizador pode optar por visualizar o gráfico de Poincaré do sinal em bruto, sem este processamento inicial. Esta funcionalidade do módulo é apresentada na Figura 32.



**Figura 31.** – Secção destinada aos inputs do utilizador para cálculo dos parâmetros  $L_{max}/W_{max}$  e *boxcount*.

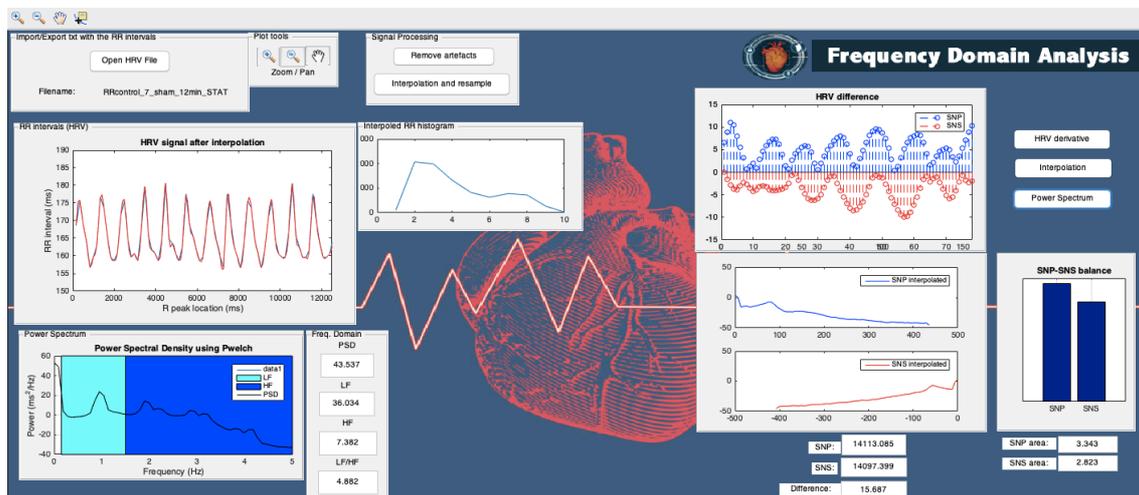
A verde, onde o utilizador deve indicar o número de *clusters* centrais e excêntricos, a forma do *cluster* central e as coordenadas dos pontos mais distantes em comprimento e em largura, obtendo os parâmetros  $L_{max}/W_{max}$  e *boxcount*.



**Figura 32.** – Secção do módulo *Poincaré Plot Analysis* que permite ao utilizador visualizar o gráfico de Poincaré do sinal antes do pré-processamento.

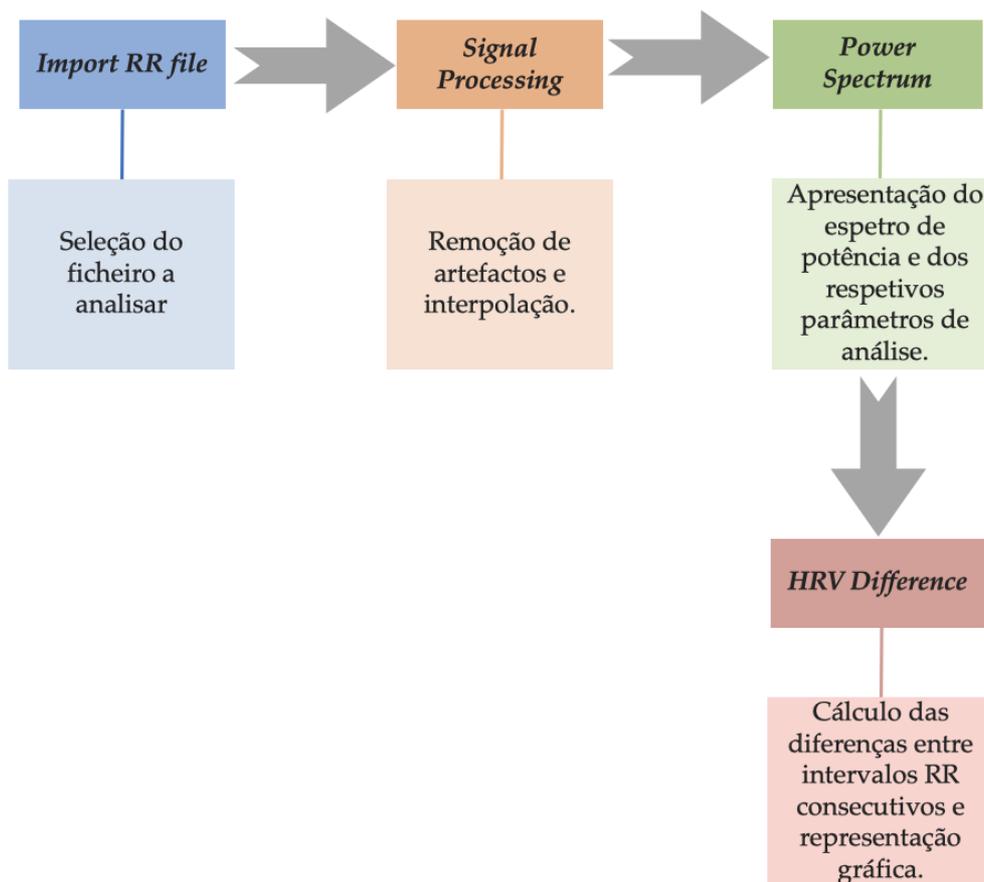
#### 4.2.2. Análise da VFC no domínio da frequência

Tal como nos outros módulos previamente apresentados, o primeiro passo é a seleção do ficheiro pretendido (ficheiro contendo os intervalos RR). É, igualmente, disponibilizado um botão *Import RR file*, que acede aos ficheiros e permite ao utilizador a seleção do ficheiro pretendido. Na Figura 33 é apresentada uma vista geral do módulo de análise no domínio da frequência.



**Figura 33.** – Ilustração de uma visão geral do módulo da interface destinado a uma análise da VFC no domínio da frequência, com recurso à apresentação, como exemplo, de uma série de intervalos RR em análise.

Este módulo da interface permite analisar graficamente a série de RR, remover artefactos, obter o espectro de potência e os respetivos parâmetros caracterizadores, bem como o cálculo das diferenças entre intervalos RR consecutivos e a apresentação gráfica e espectral dessas diferenças. A interface funciona de uma forma sequencial, sendo que as várias secções vão ficando acessíveis ao utilizador de uma forma progressiva. Na Figura 34 é apresentado o esquemático da sequência de funcionamento deste módulo.



**Figura 34.** – Fluxograma das funcionalidades do módulo da interface destinado a análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência.

Apresentação sequencial das várias secções da interface, acompanhada de uma breve descrição das funcionalidades disponíveis em cada uma das secções. As setas indicam a sucessão de acessibilidade das várias secções, ou seja, a secção seguinte apenas fica disponível ao utilizador após concluída a secção anterior.

Após seleccionado o ficheiro de intervalos RR a analisar, torna-se acessível a secção deste módulo da interface destinada ao pré-processamento do sinal de intervalos RR, através do botão *Remove artefacts*. Torna-se, então, acessível o botão *Interpolation and resample*, o qual acede a uma função que procede a, de uma forma simplificada, tornar as amostras (intervalos RR) da série igualmente espaçadas, isto é: a série de intervalos RR é composta por uma amostra (um intervalo

RR) por cada batimento cardíaco e os batimentos cardíacos não são igualmente espaçados no tempo, assim, torna-se necessário tornar as amostras (intervalos RR) igualmente espaçadas no tempo.

A interpolação é realizada através da função *interparc* do *Matlab Software*. Numa primeira fase, foi criado um vetor de tempo, o qual vai sendo incrementado intervalo RR a intervalo RR. Este vetor apresentará, então, o espaçamento temporal entre cada intervalo RR da série. A interpolação é realizada através do método *spline*, pela substituição dos intervalos RR originais por novos, igualmente espaçados no tempo. Este método tende a obter um resultado da interpolação mais suave e com menos erro que os outros métodos possíveis [66]. A função *interparc* recebe como *inputs* a dimensão da série a considerar (aqui definido como o dobro do comprimento do vetor de tempo), o vetor de tempo com o espaçamento temporal entre cada intervalo RR da série e o método da interpolação.

Imediatamente após a interpolação e nova amostragem da série, é apresentado o tacograma da nova série, o respetivo espetro de potência, os índices PSD, LF, HF e LF/HF e o histograma após a interpolação. Estes procedimentos são ilustrados na Figura 35.

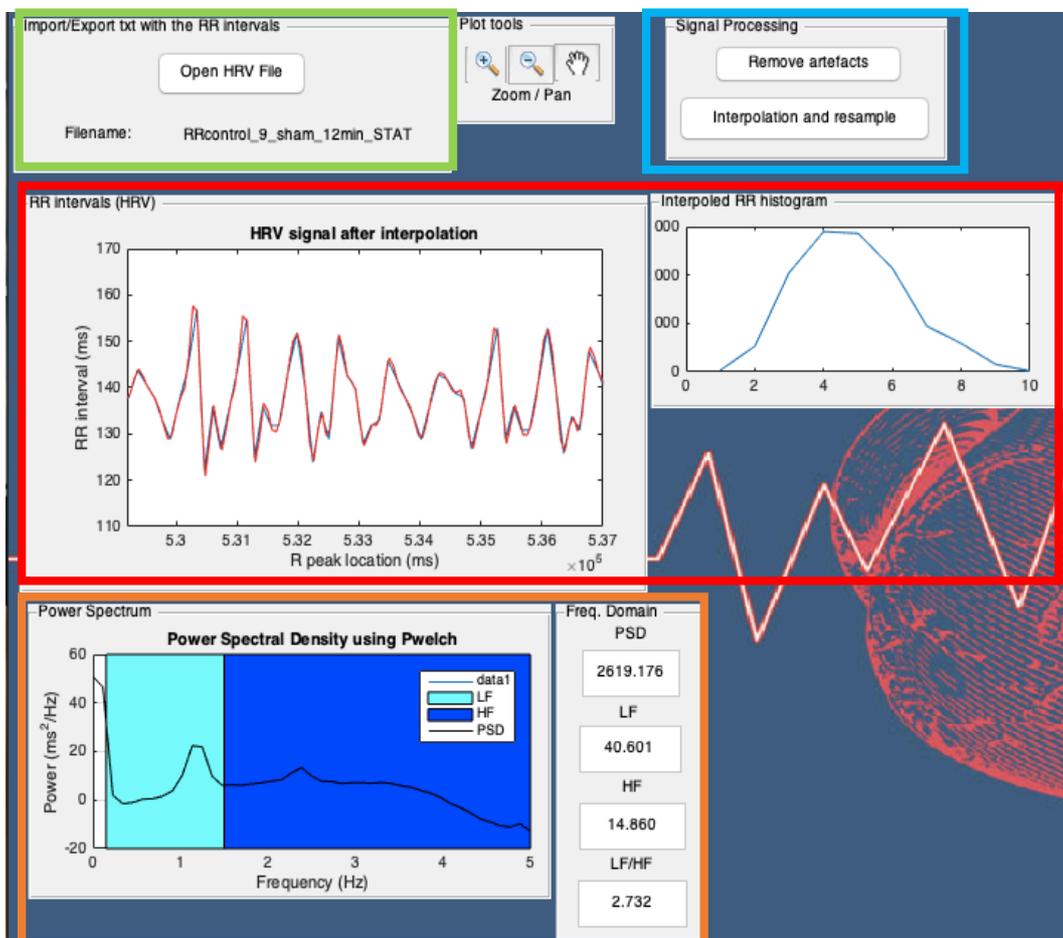
O espetro de potência da série de intervalos RR interpolada é obtido através da função *pwelch* do *Matlab Software* [67]. Esta função necessita de alguns *inputs*: a janela que define a segmentação da série, a sobreposição de pontos em cada segmento e o número de pontos a considerar na transformada de Fourier discreta. O número de segmentos em que a série será dividida para análise dependerá da janela e da sobreposição estipuladas.

O método *pwelch* consiste na divisão da série em vários segmentos de igual dimensão. De seguida, é calculada a transformada discreta de Fourier para cada segmento e obtém-se um único vetor de potências em função da frequência, ou seja, a distribuição da potência ao longo do espetro.

Uma dimensão reduzida da janela pode comprometer a resolução de frequência, na medida em que a distância entre dois pontos de frequência aumenta, o que implica uma resolução de frequência menor. Foi considerada uma janela *hamming* de 128, com 64 de sobreposição (*overlap*), por serem os valores que apresentaram uma melhor resolução do espetro de potência.

Para 0% de *overlap*, o espetro de potência torna-se mais ruidoso e irregular, quando comparado a um *overlap* de 50%. Ao aumentar a percentagem de *overlap*, para uma dada janela, aumenta-se o número total de janelas consideradas, o que ajuda na redução dos efeitos do ruído. No entanto, aumentar a percentagem de

*overlap* para 90%, ou mais, não parece ser a melhor solução, devido à alta correlação entre os pontos/amostras de cada janela e, portanto, a média não cancela os efeitos do ruído.



**Figura 35.** – Apresentação da secção destinada a remoção de artefactos e interpolação da série original, com apresentação de parâmetros de análise no domínio da frequência.

A verde, o botão onde o utilizador é encaminhado a escolher o ficheiro contendo a série que pretende analisar; a azul, os botões que permitem a remoção de artefactos e a interpolação e reamostragem da série; a vermelho, apresentação do tacograma da série, variando à medida que a série vai sofrendo alterações de processamento (no próprio tacograma, a vermelho, a série sem artefactos, devidamente interpolada e reamostrada e a azul a série após remoção de artefactos) e a laranja, apresentação do espectro de potência da série e dos parâmetros dele obtidos PSD, LF, HF e LF/HF.

Apesar dos parâmetros LF, HF e LF/HF fornecerem informação sobre as vias simpática e parassimpática do SNA, outras análises podem ser realizadas, no sentido de perceber a influência do SNS e SNP.

Neste sentido, este módulo da interface dispõe de uma funcionalidade que permite calcular as diferenças entre os vários pontos da série, isto é, obtém-se a variação das diferenças entre os vários intervalos RR consecutivos. Admitindo

que sempre que há aumento do ritmo cardíaco, existe ativação do SNS e sempre que há diminuição do ritmo cardíaco existe ativação do SNP, por forma a tentar separar as ações de cada um desses subsistemas, resolveu-se criar dois sinais distintos: um que corresponde aos instantes de aumento da FC (por diminuição dos intervalos RR) e outro que corresponde à sua diminuição. É claro que esta divisão não é, de todo, simples, uma vez que se sabe que ambos os subsistemas interagem e, portanto, não têm uma ação independente um do outro. Para além disso, um aumento da FC poderá dever-se a uma inativação do SNS. De qualquer forma, esta é uma tentativa bastante simples de criar um modelo muito simplificado de separação da ação simpática e parassimpática.

Considera-se, então, que sempre que a variação entre intervalos RR consecutivos é positiva, o que implica aumento dos intervalos RR e, portanto, diminuição da FC, se deve à atividade exclusiva do SNP. Por outro lado, considera-se que sempre que a variação entre intervalos RR consecutivos é negativa, o que implica diminuição dos intervalos RR e, portanto, aumento da FC, se deve à atividade exclusiva do SNS.

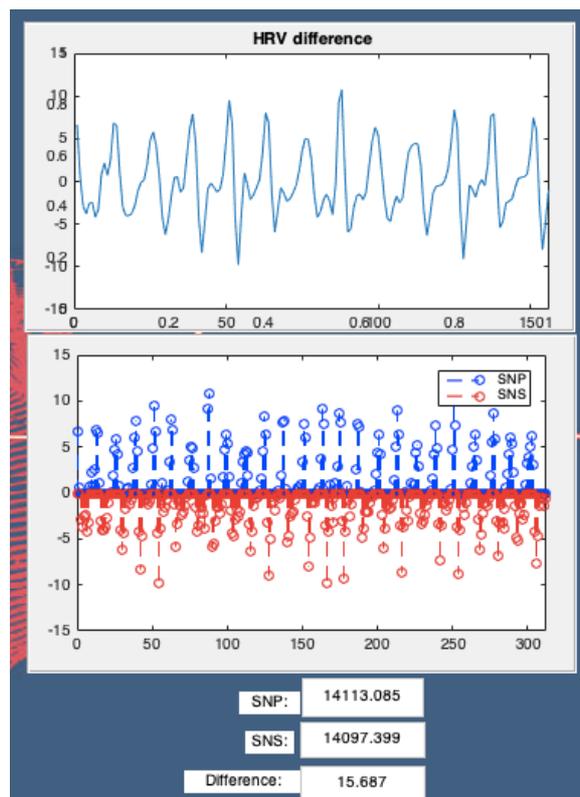
Somando todos os intervalos positivos e todos os intervalos negativos, obtém-se um valor para caracterizar o SNP e o SNS, respetivamente, bem como a discrepância entre os dois subsistemas, pela diferença entre a soma total de pontos de cada um.

Na Figura 36 é apresentado o resultado após a diferenciação da série original, bem como após a separação entre diferenças positivas e negativas.

Adicionalmente, pode ser visualizada a diferença gráfica entre as diferenças positivas e negativas após a interpolação. A informação será visivelmente mais interessante, pois assegura-se que os pontos se encontram igualmente espaçados.

Na Figura 37 é apresentada a diferença entre o gráfico das regiões da diferença (positiva e negativa) antes e após a interpolação.

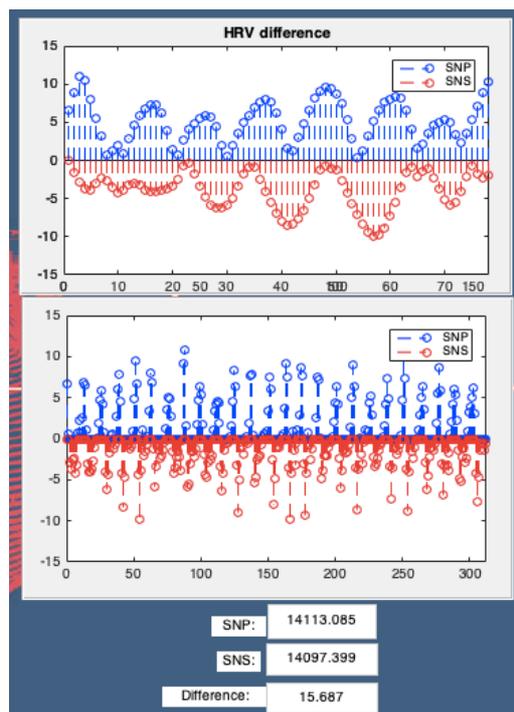
Procurou-se, ainda, inferir sobre a atividade do SNS e do SNP através da análise do espetro de potência da parte negativa e da parte positiva da função de cálculo da diferença da série de intervalos RR.



**Figura 36.** – Resultado obtido após cálculo das diferenças da série de intervalos RR, após a remoção de potenciais artefactos.

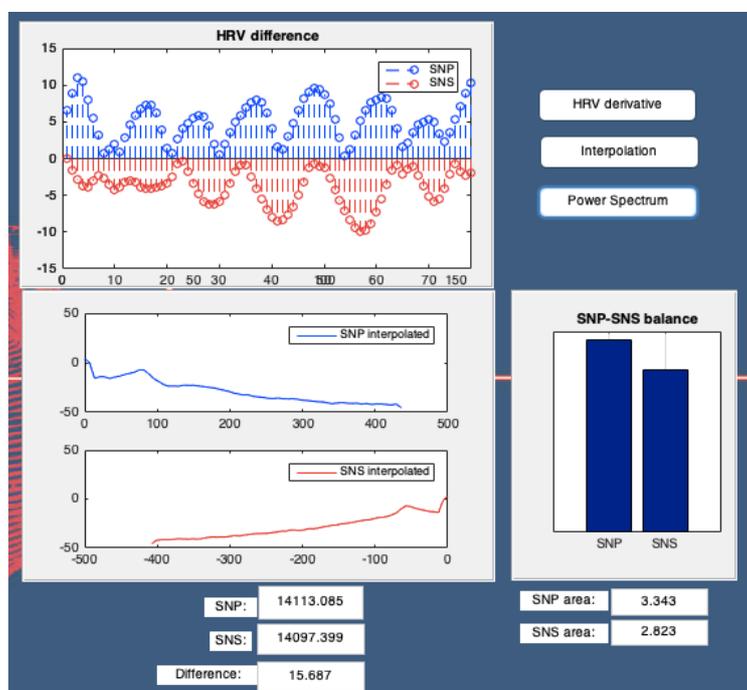
No gráfico superior: resultado após cálculo das diferenças entre intervalos RR consecutivos da série. No gráfico inferior: diferenciação entre as diferenças negativas e positivas e consequente distinção entre o SNS e o SNP, respetivamente. Apresentação dos valores da soma dos pontos de cada conjunto de diferenças (negativas e positivas) e respetiva diferença entre essas somas, representadas como SNP, SNS e Difference, respetivamente.

É disponibilizado ao utilizador um botão *Power Spectrum*. Ao clicar neste botão, o algoritmo procede ao cálculo, através da função *pwelch*, do espectro de potência das diferenças negativas e positivas previamente calculadas, em separado. São apresentados os dois espectros de potência, os quais serão uma representação da atividade da via simpática e parassimpática do SNA, respetivamente.



**Figura 37.** – Resultado obtido após cálculo das diferenças entre os intervalos RR da série após a interpolação.

No gráfico superior: distinção entre as diferenças negativas e positivas da série após interpolação. No gráfico inferior: diferenciação entre as diferenças negativas e positivas antes da interpolação.



**Figura 38.** – Secção destinada ao cálculo das diferenças entre intervalos RR da série.

No gráfico superior: distinção entre as diferenças negativas e positivas da série após interpolação. No gráfico inferior: representação do gráfico das diferenças entre intervalos RR positivas e negativas e do espectro de potência de cada uma das diferenças e associação ao SNP e SNS.

Após a obtenção destes espectros de potência distintos, a área sob cada um deles é calculada, chegando-se, assim, ao valor da potência para cada um destes espectros. Por forma a tornar a sua comparação mais intuitiva, os resultados destas áreas são apresentados em forma numérica e sob a forma de um gráfico de barras. A visualização sob a forma de gráfico de barras permite uma comparação, visualmente, bastante rápida e eficaz, concluindo-se assim sobre o balanço automático. Esta análise dos espectros de potência correspondentes à região positiva e negativa da derivada da série é ilustrada na Figura 38.

### 4.3. Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados obtidos, em qualquer estudo, assume uma extrema importância, como forma de validação desses resultados.

Um fator importante na análise estatística é a escolha do teste estatístico adequado. Para esta escolha é essencial ter conhecimento dos dados em estudo: o tipo de dados (contínuo ou ordinal/nominal), distribuição dos resultados (distribuição normal ou anormal) e tipo de amostras em análise (dependentes ou independentes).

Muitas vezes torna-se importante comparar os parâmetros populacionais obtidos com valores de referência. Tal é conseguido através de testes de hipóteses.

#### **Classificação das amostras:**

As amostras são consideradas independentes ou emparelhadas. São independentes caso não haja qualquer relação entre os elementos de cada amostras, isto é, um único elemento não pode pertencer a mais do que uma amostra. Por outro lado, caso exista uma relação entre os elementos das amostras, por exemplo, caso esses elementos sejam medidos em várias condições experimentais, em que as amostras são medições repetidas, as amostras são emparelhadas [69].

#### **Testes estatísticos:**

Uma hipótese estatística é uma previsão sobre a distribuição de variáveis. Para cada hipótese que se faça, denominada hipótese nula, há sempre uma outra hipótese, a hipótese alternativa. Se a hipótese nula for falsa, a hipótese alternativa será verdadeira.

A rejeição da hipótese nula quando esta é verdadeira é denominado erro do tipo I. A aceitação da hipótese nula quando esta é falsa é intitulado erro do tipo

II. A probabilidade do erro do tipo I, normalmente representada por  $\alpha$ , é designada como nível de significância do teste [70].

O teste será melhor quanto mais reduzidas forem as probabilidades de ambos os erros. Contudo, é matematicamente impossível minimizá-las em simultâneo, já que variam no sentido inverso. Na prática, efetuam-se testes de significância, que consistem em pré estipular o nível de significância, tipicamente são escolhidos como referência  $\alpha=0,01$ ;  $\alpha=0,05$  ou  $\alpha=0,10$  [70].

Para um teste estatístico de uma hipótese nula define-se o valor  $p$  como a probabilidade de se observarem valores da estatística de teste tão ou mais desfavoráveis à hipótese nula do que o observado [70].

No contexto em causa, considera-se suficientemente robusto um parâmetro que apresente um valor de  $p$  inferior a um  $\alpha=0,05$ . Assim, se  $p \leq 0,05$  considerar-se-á o parâmetro estudado suficientemente robusto para diferenciar o grupo do grupo de controlo.

O objetivo de um teste estatístico não é determinar se a hipótese é verdadeira, mas sim determinar a validade da hipótese perante os dados observados numa amostra da população.

Existem dois grandes tipos de testes estatísticos: paramétricos e não paramétricos. Os testes paramétricos exigem que as amostras se disponham numa distribuição normal e que as variâncias populacionais sejam homogéneas. Os testes não paramétricos não exigem o conhecimento da distribuição amostral. Os testes não paramétricos devem ser os escolhidos em situações em que as amostras são reduzidas, de diferentes dimensões e onde as variáveis em estudo não respondem aos pressupostos dos testes paramétricos [69].

Uma **análise de variância unidirecional (One-Way ANOVA)** é utilizada em contextos onde se tem mais de dois grupos, um grupo sem tratamento e grupos que receberam diferentes variações do mesmo tratamento [68].

A análise de variância unidirecional (ANOVA) é usada para determinar se existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias de três ou mais variáveis independentes.

A ANOVA unidirecional compara as médias entre os grupos e determina se algum deles é significativamente estatisticamente diferente de outro. Especificamente, testa a hipótese nula de que as médias dos vários grupos são iguais. Se, no entanto, a ANOVA unidirecional retornar um resultado estatisticamente significativo, aceita-se a hipótese alternativa, ou seja, há pelo menos duas médias de grupo que são estatisticamente diferentes das outras.

Este teste estatístico é particularmente utilizado no ramo da bioestatística.

Assim, após os resultados da análise da VFC serem obtidos, proceder-se-á a uma análise estatística destes. Para esta análise estatística devem ser considerados testes estatísticos recomendados na literatura. A escolha dos testes estatísticos a aplicar dependerá das características específicas dos dados adquiridos e dos resultados obtidos.

Numa primeira fase, serão calculados valores estatísticos típicos como a média, a mediana, o desvio padrão, entre outros. Os resultados deverão ser visualizados sob a forma gráfica, com recurso a histogramas, *box plots* ou *stem-and-leaf plots*, por forma a possibilitar uma visualização da distribuição geral dos dados e verificar possíveis incorreções inesperadas que poderão ter implicações numa análise mais pormenorizada [71].

Numa fase mais avançada, para testar hipóteses mais específicas, recorrer-se-á a testes estatísticos apropriados.

Para a escolha do teste estatístico a utilizar devem ser considerados alguns critérios, nomeadamente, o tipo de dados a classificar (quantitativos ou qualitativos), o tipo de distribuição das amostras e o tipo de dados examinados (dependentes ou independentes) [72].

Perante a análise estatística, torna-se possível concluir sobre os resultados obtidos pelo estudo.

# 5

## ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Neste capítulo serão ilustrados e interpretados os gráficos das médias de cada variável de análise da VFC em animais sujeitos a duas dietas hipercalóricas distintas e a uma dieta dita normal, bem como em animais com e sem patologia submetidos a resseção cirúrgica do NSC. Adicionalmente, serão analisados os mesmos resultados em situação de estímulo metabólico (glicose) e não metabólico (anoxia).

Os resultados são apresentados acompanhados pelas respectivas barras de erro, de acordo com os intervalos de confiança, de forma a verificar se realmente se registam diferenças significativas entre os grupos em estudo. Todos os resultados e respetivos gráficos apresentados foram previamente sujeitos a uma análise estatística e os valores fora do intervalo considerado para descrição dos dados foram excluídos. Todos os valores considerados neste capítulo estão, assim, contidos no intervalo média  $\pm 2$ \*(desvio padrão), evitando a presença de *outliers*.

Este intervalo é considerado adequado para uma descrição de uma distribuição de dados. A grande maioria de um conjunto das observações em estudo (cerca de 95%) estará contida neste intervalo. Este critério é aplicado se se considerar ou admitir a simetria da distribuição [73]. Tendo-se verificado adequado para todos os valores em estudo, por incluir mais de 95% das observações, foi considerado como intervalo de referência para todos os resultados apresentados.

Os resultados obtidos serão comparados com resultados prévios provenientes da literatura consultada e testes estatísticos serão aplicados, no sentido de compreender de forma mais clara a relação entre os vários grupos de animais e as várias variáveis em estudo.

## 5.1. Estudo da VFC no repouso: comparação entre os efeitos de diferentes dietas hipercalóricas no SNA

Por forma a compreender como a VFC varia em função de diferentes dietas hipercalóricas potenciadoras de patologia metabólica, foram analisadas as séries temporais de intervalos RR em modelos animais de roedores sujeitos a uma dieta *standard* (grupo Controlo) e a dois tipos de dietas hipercalóricas (grupos HFat e HFHSu).

Considerando uma análise da FC e VFC no repouso, ou seja, sem resposta a qualquer estímulo, notam-se algumas diferenças entre uma dieta normal e as dietas hipercalóricas estudadas.

Na Tabela 3 são apresentados os números de amostras de cada um dos grupos em estudo.

**Tabela 3.** – Número de aquisições consideradas em cada grupo de animais, para o estudo do impacto de diferentes dietas hipercalóricas no sistema nervoso autónomo (SNA).

	CONTROLO	HFat	HFHSu
N.º de aquisições	6	2	5
Total de aquisições	13		

Cada série de intervalos RR foi analisada na maior duração temporal em que a sua aquisição se mostrou estável. Para avaliar a estabilidade dos sinais, cada sinal foi analisado visualmente e verificou-se a variação do seu valor de média e variância (através da medida desvio padrão). Nos intervalos em que a média e variância do sinal se mantinham aproximadamente constantes, o sinal foi considerado como estável.

Posto isto, os sinais em estudo nesta secção têm uma dimensão temporal que varia entre 4 e 16 minutos, período em que os sinais mostraram ser estáveis. Para os parâmetros de variância (SDNN, rMSSD e SDSD), uma vez que são índices dependentes da dimensão do sinal [74], foram considerados excertos dos sinais correspondentes a 8 minutos de aquisição. Assim, cada um dos sinais foi analisado em 8 minutos da sua duração. Os sinais cuja aquisição foi de menor dimensão (inferior a 8 minutos) foram rejeitados para a análise desses parâmetros.

Na Tabela 4 são apresentados os números de aquisições considerados, em cada parâmetro, para os vários grupos de animais em estudo. De salientar que cada aquisição corresponde a um animal distinto.

**Tabela 4.** – Número de aquisições consideradas em cada parâmetro avaliado por grupo de animais.

	CONTROLO	HFat	HFHSu
MÉDIA RR	6	2	4
SDNN	4	2	4
rMSSD	4	2	4
SDSD	4	2	4
pNN20	6	2	4
pNN6	6	2	4

**Análise da VFC no domínio do tempo:**

Na Figura 39 é possível visualizar a variação da média RR e dos parâmetros de análise da VFC (SDNN, rMSSD, SDSD, pNN20 e pNN6) em animais sujeitos a uma dieta dita normal e aos dois tipos de dietas hipercalóricas em estudo.

A duração dos intervalos RR parece aumentar ligeiramente, comparativamente aos animais controlo, em animais sujeitos a uma dieta HFat. Por outro lado, o mesmo não é possível verificar numa dieta HFHSu (Figura 39(A)). Em animais sujeitos a uma dieta HFHSu nota-se uma ligeira redução dos intervalos RR. Os valores acabam por não ser muito divergentes entre si. Assim, pode-se salientar que, tendencialmente, a duração dos intervalos RR acaba por se manter relativamente conservada quando seguida uma dieta hipercalórica e, por conseguinte, na presença de patologia de resistência à insulina. No entanto, animais com patologia metabólica parecem tender a apresentar uma FC sensivelmente mais elevada do que animais saudáveis.

Se se considerar o valor médio dos intervalos RR e, partindo dele, se aferir sobre a FC, como exemplificado na equação 4.2, são notadas ligeiras diferenças entre os animais saudáveis e os animais patológicos do grupo HFHSu. O grupo de animais sujeito a uma dieta hipercalórica sem consumo acrescido de açúcares (grupo HFat) mostra uma ligeira e pouco significativa diminuição da média da FC, por comparação ao grupo de controlo. Por outro lado, o grupo sujeito a uma dieta hipercalórica com consumo acentuado de açúcar (grupo HFHSu), que representa um estadio mais avançado de resistência insulínica, apresenta um pequeno aumento da FC, comparativamente ao grupo de controlo ( $492 \pm 206$  bpm para o grupo HFHSu *vs*  $365 \pm 71$  bpm para o grupo Controlo).

Um estado mais avançado de patologia metabólica, como a Diabetes tipo 2, provocará um ligeiro aumento da FC, por comparação aos valores em animais sem patologia, por diminuição da duração média dos intervalos RR.

Quando se atenta nos índices de análise da VFC, algumas diferenças começam a ser mais notórias e o efeito de diferentes dietas é observado. Os animais dos grupos HFat e HFHSu apresentam menores valores de SDNN, rMSSD, SDDSD, pNN20 e pNN6, em relação aos animais do grupo Controlo, e, portanto, uma menor VFC.

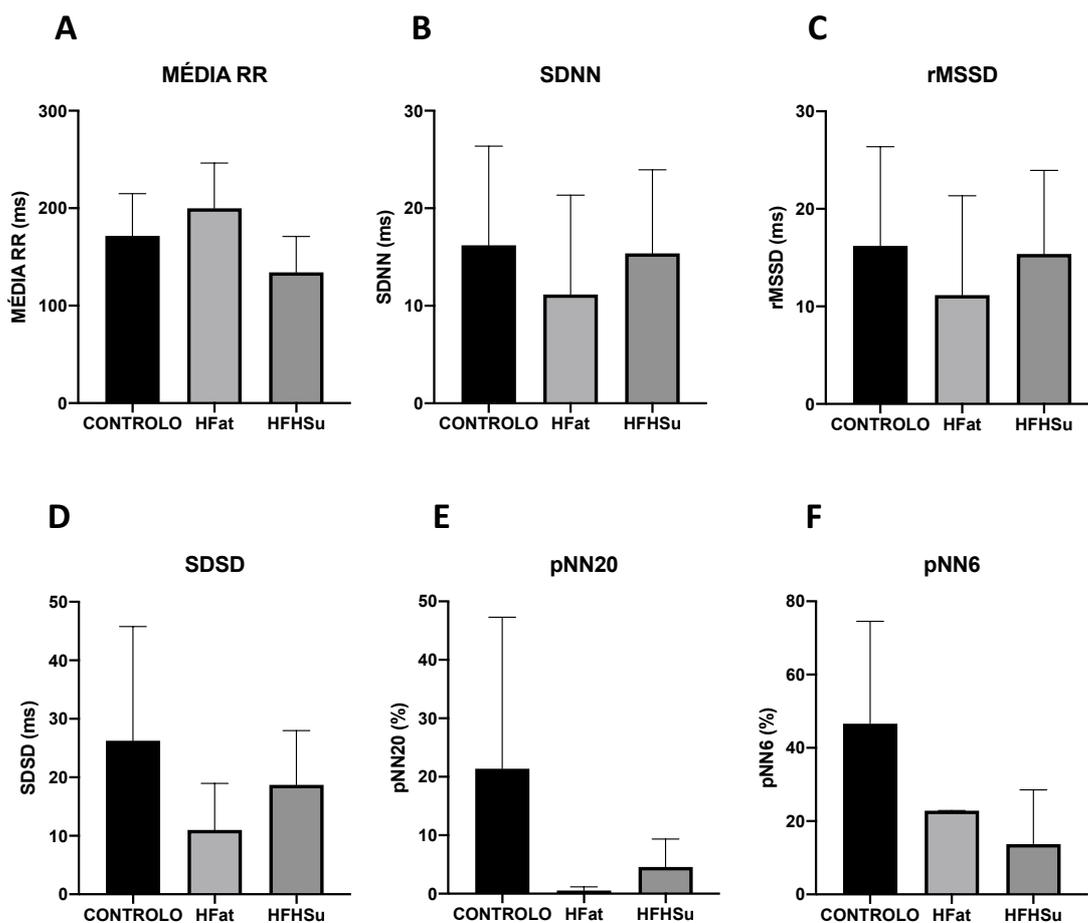
Os resultados obtidos para os índices SDNN e rMSSD são sensivelmente semelhantes entre os vários grupos, notando-se uma ligeira redução nos grupos HFat e HFHSu. Os valores de pNN20 e pNN6 apresentam diferenças mais significativas entre o grupo não patológico e os grupos com patologia, sendo ambos menores nos segundos.

O índice SDNN fornece informação a longo prazo, sendo um parâmetro de análise global da VFC. Por outro lado, os parâmetros rMSSD e pNN20 ou pNN6 são baseados nas diferenças entre intervalos consecutivos e, portanto, facultam uma informação a curto prazo. Estes últimos refletem alterações maioritariamente parassimpáticas no tónus autonómico do coração.

O parâmetro SDDSD transmite informação no curto prazo, entre batimentos cardíacos adjacentes e, portanto, é maioritariamente influenciado enquanto reflexo da atividade parassimpática. Em animais sujeitos a dietas hipercalóricas, este parâmetro apresenta um valor mais baixo, não sendo, no entanto, estatisticamente significativo, do que em animais expostos a uma dieta *standard*.

Neste sentido, pode-se dizer que existe uma tendência para que a atividade do SNP, em ratos intolerantes à glicose e/ou resistentes à insulina, se encontre prejudicada. Nota-se uma diminuição do tónus de origem vagal na regulação cardíaca destes animais, por redução relevante dos valores de rMSSD, SDNN, pNN20 e pNN6, não sendo, no entanto, esta redução estatisticamente significativa.

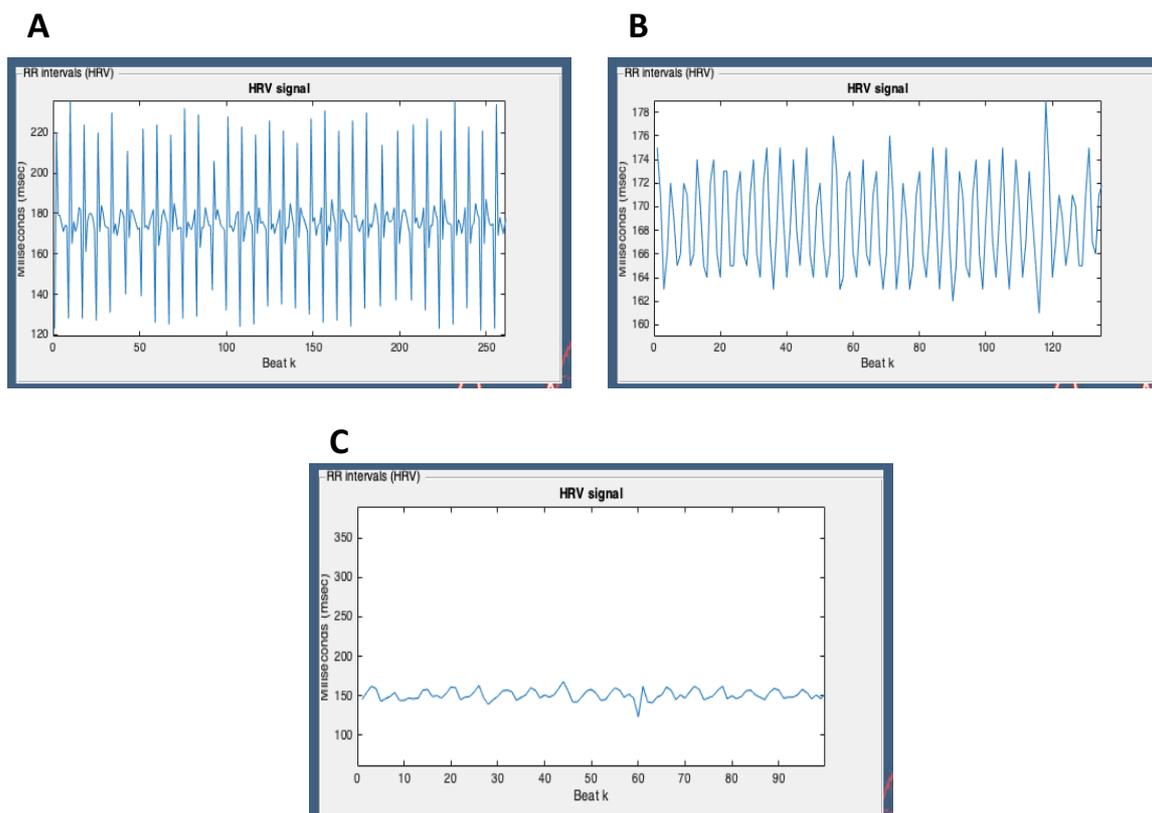
Quando se consideram as diferenças entre as dietas hipercalóricas, as quais estão na origem do desenvolvimento de distúrbios metabólicos, os resultados previamente mencionados parecem estar mais evidentes em animais sujeitos à dieta HFat. No entanto, este grupo apresenta um número reduzido de amostras (apenas dois ratos) e, portanto, será pouco rigoroso concluir sobre este. Todavia, os resultados apresentados permitem observar que qualquer uma das dietas hipercalóricas em estudo acarreta, para além de desenvolvimento de patologia metabólica, alterações no SNA e, conseqüentemente, na regulação cardíaca.



**Figura 39.** – Efeito de dietas hiperclóricas no sistema nervoso autônomo (SNA), resultado de uma análise no domínio do tempo: representação gráfica dos índices utilizados para análise da VFC nos vários grupos de animais em estudo.

Representação da média e respetivo erro (desvio padrão): (A) comportamento do índice média RR (em milissegundos); (B) índice SDNN; (C) índice rMSSD; (D) índice SDDS; (E) índice pNN20 (em percentagem); (F) índice pNN6 (valores percentuais).

Por observação direta da representação gráfica das séries de intervalos RR em bruto (sem processamento do sinal), para os três grupos em estudo, nota-se que existe uma tendência para que a patologia metabólica tenda a uniformizar a série, isto é, na presença de patologia metabólica, observa-se um sinal mais constante, com menos variação e, portanto, menor variabilidade. Esta redução de variabilidade é mais notória para um estadiu mais avançado da patologia. Estes resultados são ilustrados na Figura 40.

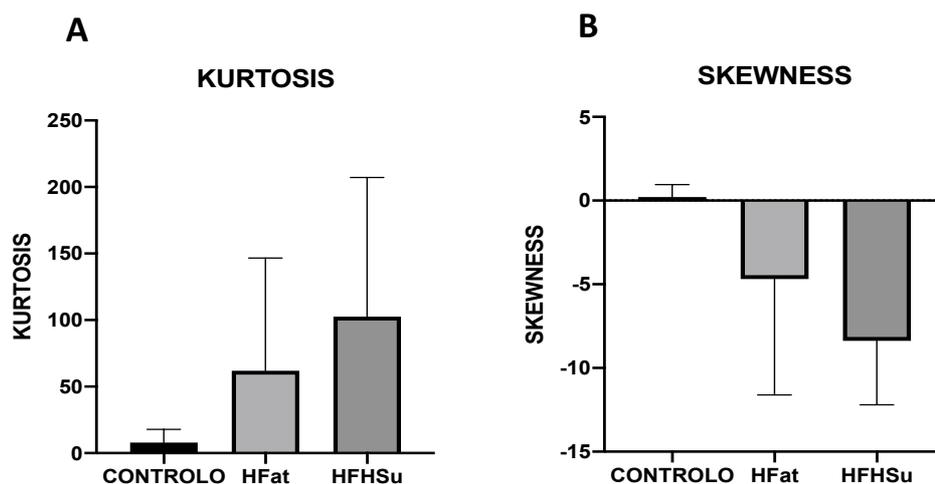


**Figura 40.** – Exemplos de representação gráfica de séries temporais RR em estudo, para cada grupo de animais. Tem-se: (A) para um animal controlo; (B) para um animal do grupo HFat; (C) para um animal do grupo HFHSu.

Foram analisados, também, índices estatísticos, relacionados com a própria distribuição da série de RR em estudo. Na Figura 41 são ilustrados os resultados de *kurtosis* e *skewness*.

Os roedores expostos a dietas hipercalóricas têm tendência para apresentar uma distribuição do sinal RR com pico mais pronunciado e com maior assimetria, afastando-se mais de uma distribuição normal do que em animais expostos a uma dieta *standard*.

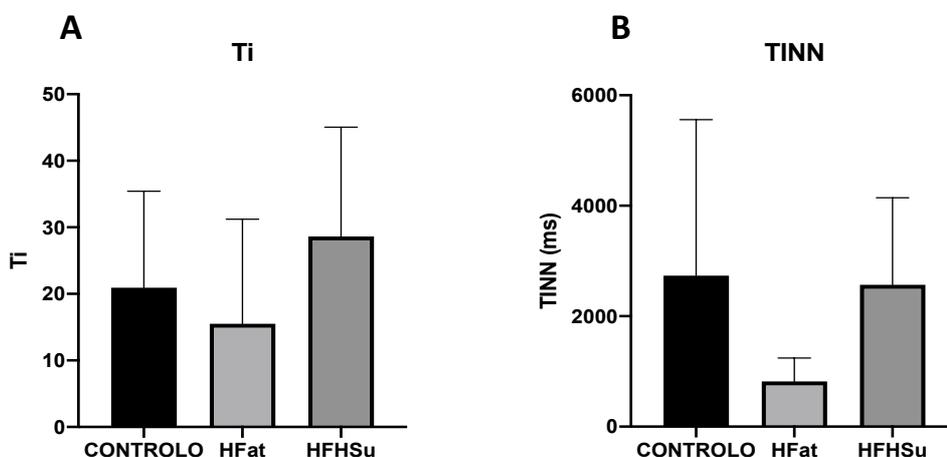
Uma distribuição mais achatada poderá ser sinal de um número elevado de valores mais distantes do valor médio da distribuição em estudo. Poderá ser indício de que os animais saudáveis apresentarão maior variabilidade no seu sinal RR.



**Figura 41.** – Efeito de dietas hipercalóricas no sistema nervoso autônomo (SNA), resultado de uma análise no domínio do tempo dos parâmetros descritivos das distribuições de intervalos RR, nos vários grupos de animais em estudo.

Representação da média e respetivo erro para os parâmetros: (A) *kurtosis*; (B) *skewness*.

Tendo por base o histograma da série temporal de intervalos RR, parâmetros de origem geométrica podem ser extraídos. Neste sentido, os resultados destes índices são apresentados na Figura 42.



**Figura 42.** – Índices geométricos de análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC). A saber: (A) *Ti*; (B) *TINN*.

Animais expostos a uma dieta hipercalórica HFat apresentam um valor do índice *Ti* muito semelhante a animais controlo e uma redução do índice *TINN*. Há, portanto, diferenças muito pouco significativas nos histogramas obtidos para animais com e sem patologia. Volta-se a salientar que as dimensões dos grupos são bastante reduzidas, o grupo HFat apenas tem dois elementos e, portanto, os resultados apresentados não são conclusivos.

### **Análise da VFC no domínio da frequência:**

Quando considerada uma análise no domínio da frequência, as diferenças entre os grupos são ainda mais nítidas.

Na Figura 43 são apresentados os resultados obtidos no domínio da frequência, para os vários grupos de animais em estudo.

Os animais sujeitos a uma dieta rica em calorias e em açúcares (HFHSu) apresentam um valor mais elevado de LF e de LF/HF e um valor mais reduzido de HF, quando comparados aos animais expostos a uma dieta hipercalórica sem excesso de açúcar e aos animais com uma alimentação dita normal.

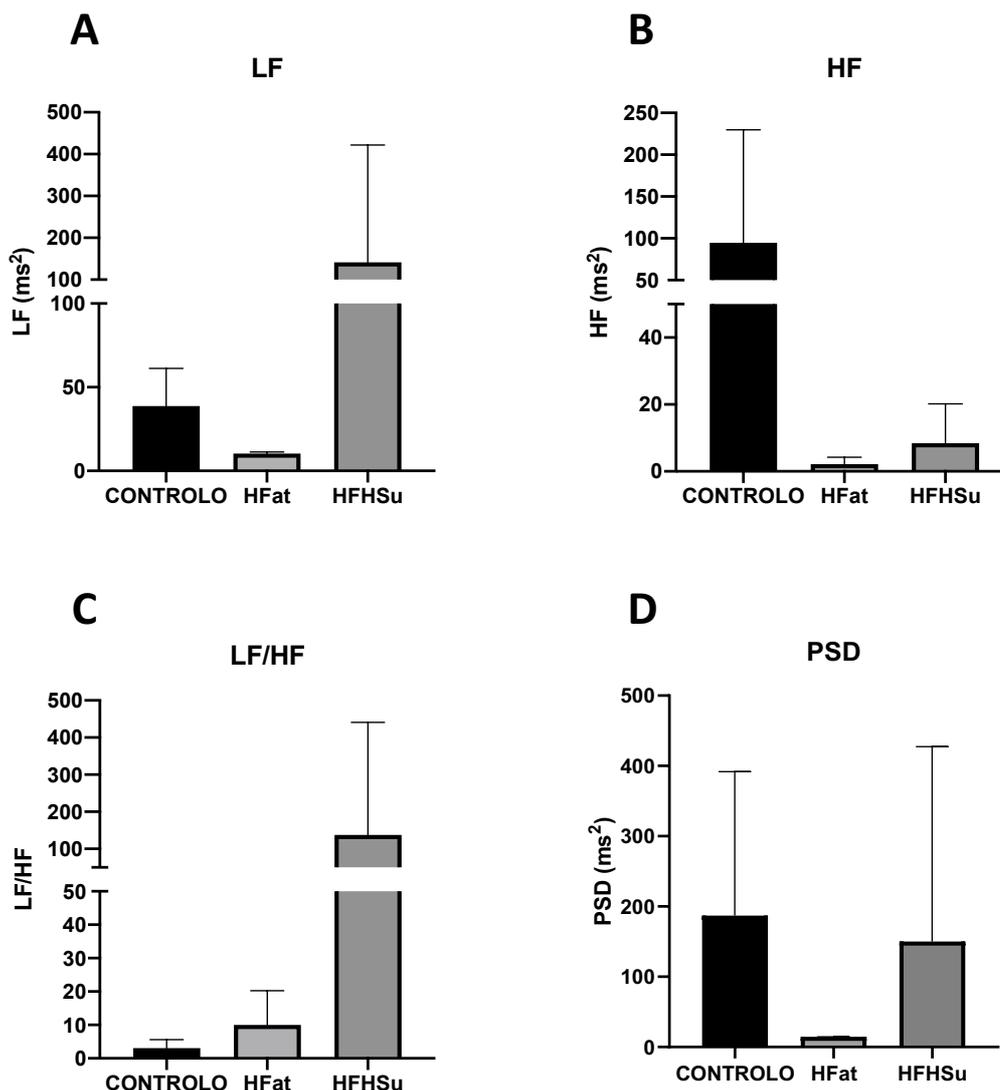
Um aumento do rácio LF/HF em relação à condição de controlo é notado em ambos os grupos de animais expostos a dietas hipercalóricas, sendo mais evidente para o grupo HFHSu (Figura 43 (C)).

Nota-se um aumento do valor de LF e uma redução do valor HF em animais do grupo HFHSu, em relação aos grupos Controlo e HFat (Figura 43 (A), (B) e (D), respetivamente). Pode-se, então, verificar que estes animais apresentarão uma atividade do SNS amplificada, acompanhada de uma limitação da atividade do SNP.

O índice HF é tido como medida da atividade do SNP, ou seja, da atividade vagal, enquanto que o índice LF reflete a atividade do SNS.

Tendo por base os resultados obtidos, pode-se verificar que a redução da atividade parassimpática, redução da potência das altas frequências (HF), não implica a redução da potência total (PSD). O aumento da atividade simpática, por aumento da potência das baixas frequências (LF) será suficiente para manter o índice PSD em valores de controlo.

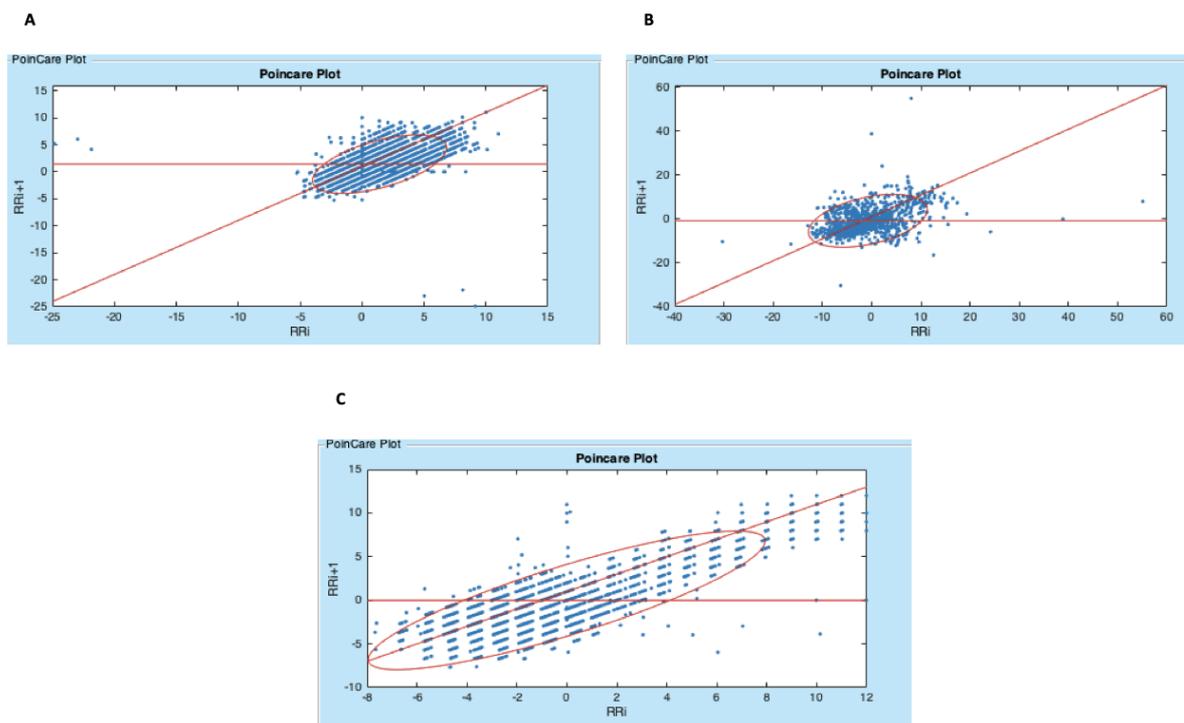
As diferenças são mais significativas no grupo HFHSu do que no grupo HFat, em comparação ao grupo Controlo. No grupo HFat, nota-se uma redução dos valores de LF e HF, bem como um ligeiro aumento do rácio LF/HF.



**Figura 43.** – Efeito de dietas hipercalóricas no SNA. Índices calculados no domínio da frequência. Representação gráfica dos parâmetros utilizados para análise da VFC por exibição da média e respetivo erro (desvio padrão): (A) LF; (B) HF; (C) LF/HF; (D) PSD.

### Análise da VFC por métodos não lineares no domínio do tempo:

Quanto à forma das dispersões de Poincaré, não se registam diferenças significativas entre os grupos. A maioria dos animais apresenta um gráfico de Poincaré com uma forma de Torpedo. Alguns animais apresentam outras formas distintas, independentemente do grupo. Na Figura 44 é apresentado um exemplo, para cada grupo, da representação dos gráficos de Poincaré.



**Figura 44.** – Ilustração de exemplos de gráficos de Poincaré para os vários grupos de animais em estudo.

Note-se que: em (A) o gráfico de Poincaré representado pertence a um animal controle; em (B) está representado um gráfico de Poincaré de um animal do grupo HFat e em (C) de um animal do grupo HFHSu.

Nota-se que as formas dos gráficos de Poincaré se mantêm sensivelmente semelhantes entre os vários grupos em estudo. Todos os exemplos apresentados apresentam uma forma de Torpedo. No entanto, nota-se que, no grupo HFHSu, a forma parece se mais comprimida e menos dispersa.

Na Tabela 5 são apresentadas as várias formas obtidas para os gráficos de Poincaré dos animais dos vários grupos.

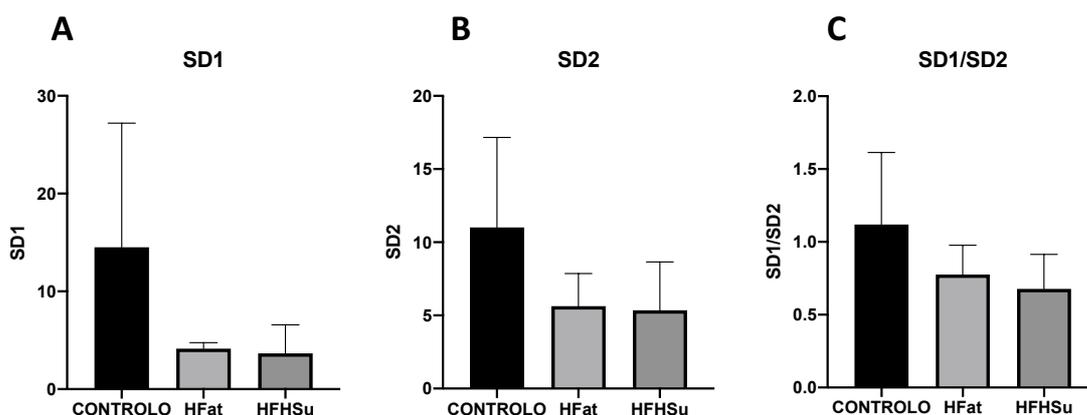
Conclui-se, então, que uma análise quantitativa, por meio dos parâmetros de medição da dispersão SD1 e SD2, será mais rigorosa na diferenciação entre os vários grupos. Na Figura 45 são apresentados os resultados obtidos para os vários grupos de roedores, para os parâmetros de quantificação da dispersão de Poincaré SD1, SD2 e SD1/SD2.

Nota-se uma redução de ambos os parâmetros de análise dos gráficos de Poincaré (SD1 e SD2) e uma conseqüente redução no rácio SD1/SD2 para animais expostos a dietas hipercalóricas. A redução é mais evidente no índice SD1, o qual transmite variabilidade num curto período temporal. Assim, a variabilidade da série temporal de intervalos RR encontra-se comprometida na presença de patologia metabólica.

**Tabela 5.** – Apresentação das formas das dispersões dos gráficos de Poincaré obtidas para os vários grupos de roedores, no estudo do impacto de diferentes dietas hipercalóricas.

Exibição do número e valor percentual dos tipos de formas obtidas em cada um dos grupos.

Grupo	Forma da dispersão de Poincaré	N	%
Controlo	Forma de Torpedo	2	32
	Padrão de Lóbulo triplo	1	17
	SZ-Leque	1	17
	Padrão de ilha do tipo A	1	17
	Padrão de ilha do tipo B	1	17
HFat	Forma de Torpedo	2	100
HFHSu	Forma de Torpedo	3	60
	Padrão de ilha do tipo B	1	20
	Indefinida	1	20



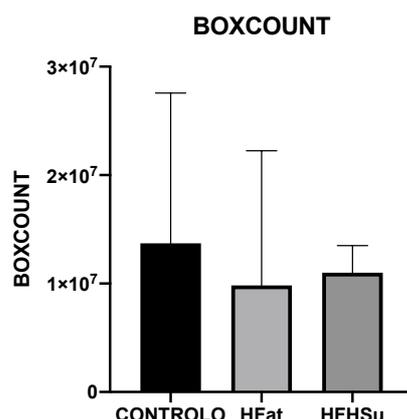
**Figura 45.** – Efeito de dietas hipercalóricas no SNA por índices de análise das dispersões de Poincaré.

Tem-se: (A) SD1; (B) SD2; (C) rácio SD1/SD2.

Um rácio SD1/SD2 mais baixo indica um batimento cardíaco mais regular e está tipicamente relacionado com uma condição patológica [39].

O parâmetro *boxcount* avalia a área de ocupação da dispersão de Poincaré do conjunto de pontos da série temporal de RR. Um maior valor de *boxcount* estará relacionado com uma maior dispersão dos pontos, logo, com uma maior variabilidade dos intervalos RR.

Na Figura 46 são apresentados os valores médios do parâmetro *boxcount* para os três grupos de animais em estudo.



**Figura 46.** – Representação da variação do parâmetro *boxcount*, resultado de uma análise do gráfico de Poincaré, nas diferentes dietas.

Os valores são semelhantes entre os grupos. No entanto, parece haver alguma tendência para uma ligeira redução do parâmetro *boxcount* para animais com patologia metabólica, em relação a animais sem patologia. Uma redução deste parâmetro poderá ser indicativa de uma menor variabilidade entre os intervalos RR.

#### **Análise por testes estatísticos dos resultados obtidos nos vários domínios:**

Uma análise estatística de todos os resultados permite verificar a significância das diferenças encontradas entre os grupos em estudos e, deste modo, caracterizar de forma mais fidedigna o impacto de dietas hipercalóricas no SNA. Na Tabela 6 são apresentados os resultados (valor de *p*) para um teste unidirecional de variância (*One-Way ANOVA*) para os vários parâmetros estudados, comparando os grupos de animais expostos a dietas hipercalóricas com o grupo de controlo.

**Tabela 6.** – Apresentação dos resultados de uma análise de variância unidirecional (*One-Way ANOVA*) na avaliação do impacto de diferentes dietas hipercalóricas no sistema nervoso autónomo.

Ambos os grupos (HFat e HFHSu) são comparados ao grupo Controlo e é apresentado o valor de *p* para cada parâmetro analisado e cada grupo estudado.

	Grupo	Valor de <i>p</i>	Estatisticamente significativo?
MÉDIA FC	HFat	0,8568	Não
	HFHSu	0,2919	Não
MÉDIA RR	HFat	0,6408	Não

CAPÍTULO 5. ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

<b>SDNN</b>	HFHSu	0,2881	Não
	HFat	0,7744	Não
<b>rMSSD</b>	HFat	0,7741	Não
	HFHSu	0,9881	Não
<b>SDSD</b>	HFat	0,3927	Não
	HFHSu	0,6576	Não
<b>pNN20</b>	HFat	0,3379	Não
	HFHSu	0,2870	Não
<b>pNN6</b>	HFat	0,3585	Não
	HFHSu	0,0598	Não
<i>Kurtosis</i>	HFat	0,6750	Não
	HFHSu	0,1988	Não
<i>Skewness</i>	HFat	0,2769	Não
	HFHSu	0,0156	*
<b>Ti</b>	HFat	0,8843	Não
	HFHSu	0,6515	Não
<b>TINN</b>	HFat	0,5120	Não
	HFHSu	0,9897	Não
<b>LF</b>	HFat	0,9779	Não
	HFHSu	0,6247	Não
<b>HF</b>	HFat	0,4343	Não
	HFHSu	0,2884	Não
<b>PSD</b>	HFat	0,7579	Não
	HFHSu	0,3136	Não
<b>LF/HF</b>	HFat	0,9987	Não
	HFHSu	0,4502	Não
<b>SD1</b>	HFat	0,3330	Não
	HFHSu	0,1417	Não
<b>SD2</b>	HFat	0,3494	Não
	HFHSu	0,1516	Não
<b>SD1/SD2</b>	HFat	0,4876	Não

<i>Boxcount</i>	HFHSu	0,1561	Não
	HFat	0,8776	Não
	HFHSu	0,8902	Não

Observações: \* $p < 0,005$

Conclui-se, então, que apenas o parâmetro *skewness* mostra ser estatisticamente relevante na diferenciação do grupo HFHSu do grupo Controle, assumindo um valor de  $\alpha=0,005$ , tal como explicado na secção 4.3.

Esta baixa significância dos parâmetros na distinção entre grupos pode ser justificada pela dimensão reduzida dos grupos.

De qualquer modo, é possível verificar que os parâmetros média RR, *kurto-sis*, *skewness*, HF, PSD, SD1, SD2 e SD1/SD2 são os que apresentam valores mais baixos de  $p$  e, portanto, tenderão a ser mais distintos entre animais com e sem patologia, principalmente, entre o grupo Controle e o grupo HFHSu.

Os resultados apresentados estão de acordo com resultados previamente obtidos, em contexto semelhante, e disponíveis na literatura. No que à FC e VFC concerne, sujeitos diabéticos apresentam, tipicamente, valores de média RR, SDNN e rMSSD mais baixos [31], [54].

A redução da VFC em animais diabéticos reflete a existência de alterações autonómicas, mesmo numa fase inicial da patologia, nomeadamente, uma diminuição da função autonómica, ou seja, uma diminuição da atividade do SNA, sugerindo uma atividade simpática aumentada e/ou uma atividade vagal reduzida [31], [54].

## 5.2. Estudo da VFC em situação de estímulo: comparação entre os efeitos de diferentes dietas hiperca-lóricas no SNA

A influência da patologia metabólica no SNA pode estar intimamente relacionada com a resposta autonómica, isto é, uma condição de patologia metabólica (Obesidade, Síndrome Metabólico ou Diabetes) pode ter como consequência uma resposta autonómica deficitária num momento de estímulo. Assim, são analisadas séries temporais de intervalos RR em animais saudáveis e patológicos, em resposta a um estímulo não metabólico (anoxia) e a um estímulo metabólico (glucose).

Na secção anterior é descrito que a patologia metabólica, induzida por uma dieta hipercalórica, provoca neuropatia do SNA, por um aumento da atividade do SNS sem compensação da atividade opostora do SNP. Esta discrepância entre a atividade das vias simpática e parassimpática do SNA poderá prejudicar a resposta a um estímulo.

### 5.2.1. A VFC no estímulo de Anoxia

O miocárdio é particularmente sensível a períodos de anoxia, pois o coração é um órgão fortemente dependente de um fornecimento contínuo e não intermitente de oxigénio, pelas características da sua atividade. Curtos períodos de anoxia são suficientes para causar danos ao nível do miocárdio.

Estudos demonstram que a anoxia provoca uma redução do consumo de oxigénio pelo miocárdio. Este consumo é reversível, concluindo tratar-se de um resultado consequente de uma alteração nas condições ideais e não de uma alteração patológica irreversível [75].

Para perceber a forma como o próprio miocárdio é afetado por uma condição de anoxia, bem como, como esta condição afeta a resposta do SNA em condições de presença e ausência de patologia metabólica, foram analisadas séries temporais de intervalos RR de um animal saudável e de animais diabéticos. O número de aquisições consideradas é apresentado na Tabela 7.

**Tabela 7.** – Número de aquisições consideradas em cada grupo de animais, para estudo da VFC no estímulo de anoxia.

	CONTROLO	HFHSu
N.º de aquisições	1	5
Total de aquisições	6	

#### **Análise da VFC no domínio do tempo:**

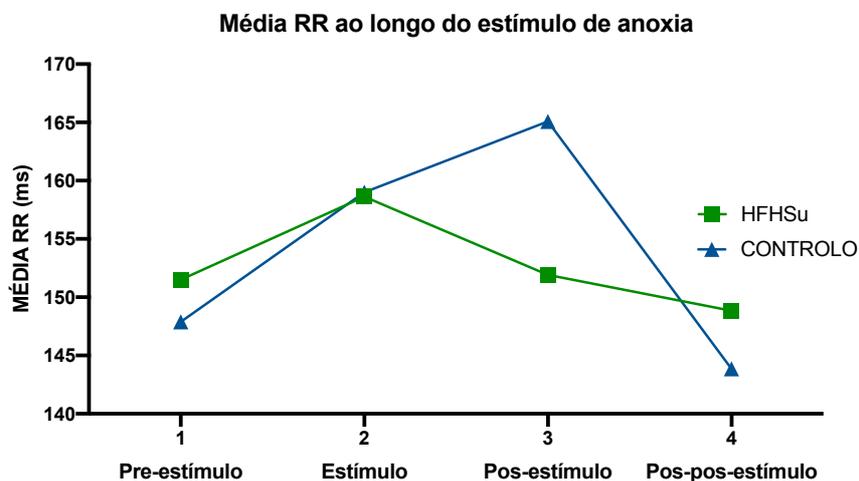
No rato saudável, nota-se, no exato momento em que decorre o estímulo, um ligeiro aumento da média dos intervalos RR. Este aumento é progressivo e atinge o seu valor máximo no intervalo considerado como pós-estímulo, 15 segundos imediatamente após o estímulo. Passados 2 minutos, o valor de RR tende a voltar a um valor basal, semelhante ao valor pré-estímulo.

Em animais com patologia metabólica, modelos de Diabetes tipo 2, a duração média dos intervalos RR tende a permanecer aproximadamente constante ao longo da aquisição, quer antes, quer após o estímulo de anoxia.

Assim, nota-se uma ligeira diminuição da FC no momento do estímulo e nos 15 segundos seguintes, em relação ao valor pré-estímulo, tido como basal,

para o rato saudável. Em animais com patologia, não se verifica alteração significativa nos valores de FC.

Na Figura 47 é apresentada a evolução do valor da média RR ao longo da aquisição, isto é, antes, durante e após o momento de anoxia (estímulo), num animal controlo e num animal modelo de Diabetes.

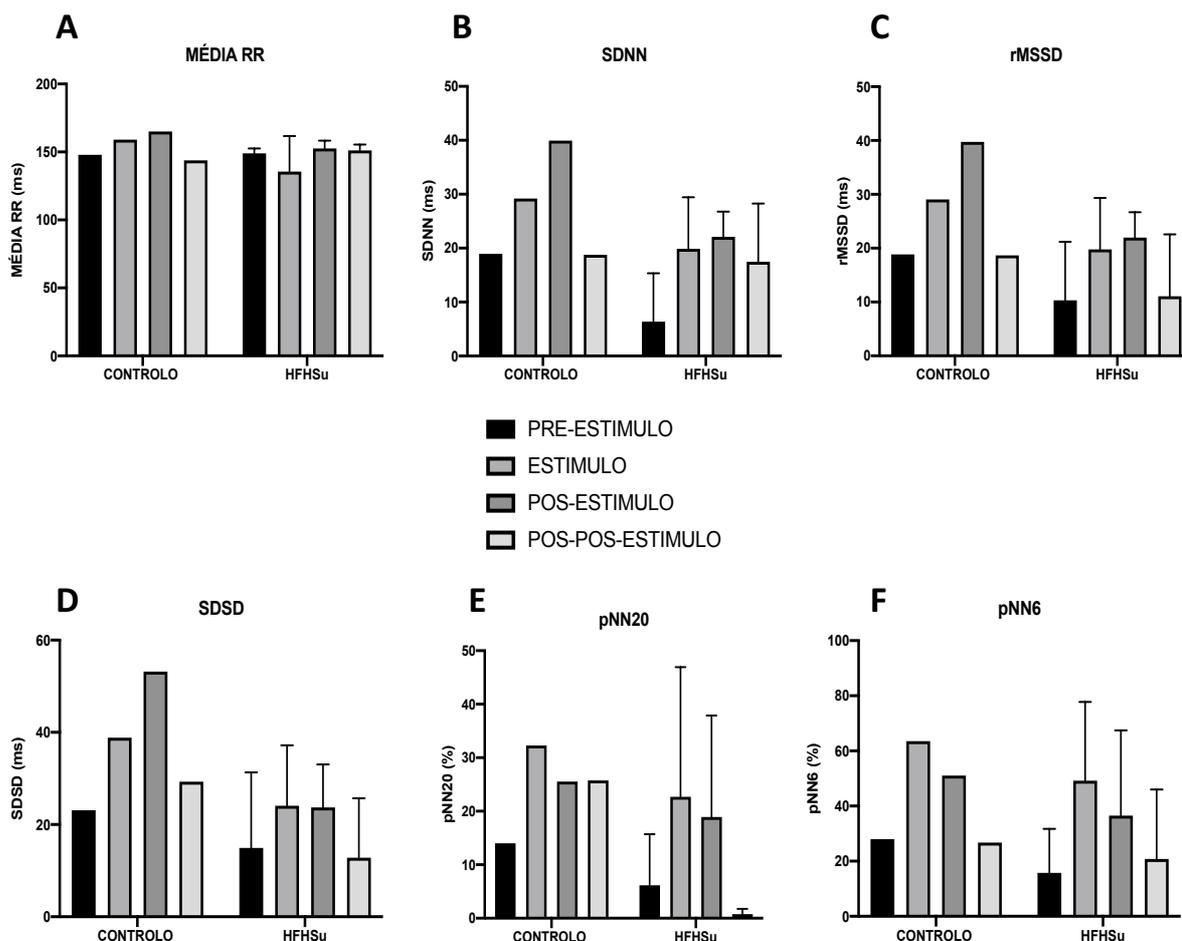


**Figura 47.** – Comportamento da média de intervalos RR, em milissegundos, num animal saudável e num animal com patologia metabólica.

Representação gráfica do valor da média RR no animal saudável (CONTROLO) e para um animal do grupo patológico (HFHSu).

Na Figura 48 são apresentados os resultados obtidos para os índices de análise da VFC ao longo da aquisição, considerando momentos antes, durante e após o estímulo, em ambos os grupos de animais em estudo.

Quando se consideram os parâmetros de análise da variabilidade do sinal, em animais sem patologia, verifica-se um aumento dos valores de SDNN, rMSSD e SDDSD aquando da privação de oxigénio e, imediatamente após o estímulo, um aumento mais significativo, seguido de uma diminuição e retorno a um valor aproximado ao valor pré-estímulo. Todos estes índices apresentam um perfil de variação comum, ao longo da aquisição. Os valores de pNN20 e pNN6 são máximos no momento do estímulo.



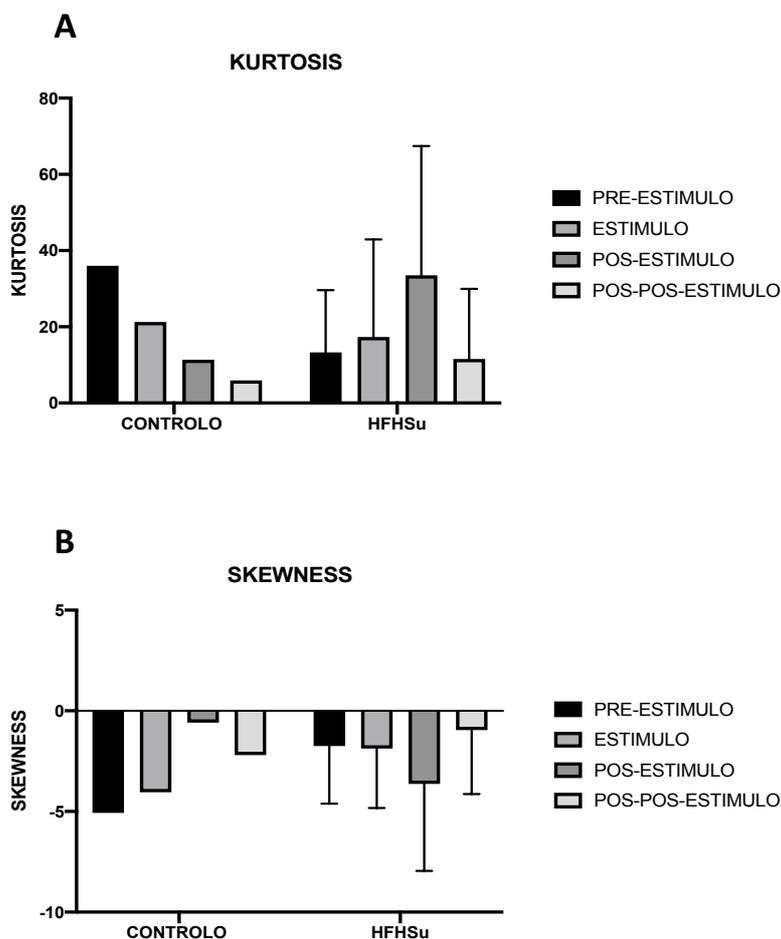
**Figura 48.** – Efeito de patologia metabólica na resposta autonómica a uma condição de anoxia. Representação gráfica dos índices utilizados para análise da VFC, no domínio do tempo, nos vários grupos de animais em estudo: (A) comportamento do índice média RR (em milissegundos); (B) índice SDNN; (C) índice rMSSD; (D) índice SDD; (E) índice pNN20 (em percentagem); (F) índice pNN6 (valores percentuais).

Para ratos diabéticos, grupo HFHSu, constata-se que o perfil de alterações dos valores de SDNN, rMSSD e SDD é semelhante ao apresentado pelo rato saudável, salvaguardando-se que os valores destes parâmetros são mais baixos e que as variações registadas são menos significativas. Aquando da anoxia, nota-se um aumento dos valores destes índices, em relação ao estado basal, e, imediatamente após o estímulo, regista-se outro aumento. A diferença entre o estado estímulo e pós-estímulo é menos significativa em ratos com patologia. Os valores de pNN20 e pNN6 variam de forma análoga à variação no rato saudável, registando-se os seus valores máximos no momento do estímulo.

Analisando a distribuição dos valores de RR ao longo da aquisição, nota-se, no animal controlo sem patologia, uma diminuição progressiva da *kurtosis* após o estímulo de anoxia. Estes resultados são apresentados na Figura 49.

O valor absoluto de *skewness* tende a diminuir após uma condição de anoxia e apresenta uma maior diferença no período imediatamente após o estímulo, onde alcança o seu valor mais baixo. Isto implica que: em termos de achatamento, verifica-se uma redução progressiva da notoriedade do pico, implicando uma aproximação a uma distribuição normal ao longo do tempo; em relação à simetria, a distribuição apresenta uma maior simetria após o estímulo, tendendo para um valor próximo de uma distribuição normal. Passados alguns minutos, a assimetria da distribuição volta a aumentar.

Em animais com patologia de resistência à insulina e/ou intolerância à glicose, verifica-se um aumento da expressividade do pico da distribuição nos instantes após a anoxia, por um aumento do valor de *kurtosis*. Quanto à simetria, a distribuição tende a ser mais assimétrica após o estímulo, afastando-se mais de uma distribuição normal. Passados alguns minutos, a simetria tende a reduzir, notado por redução do valor de *skewness*.

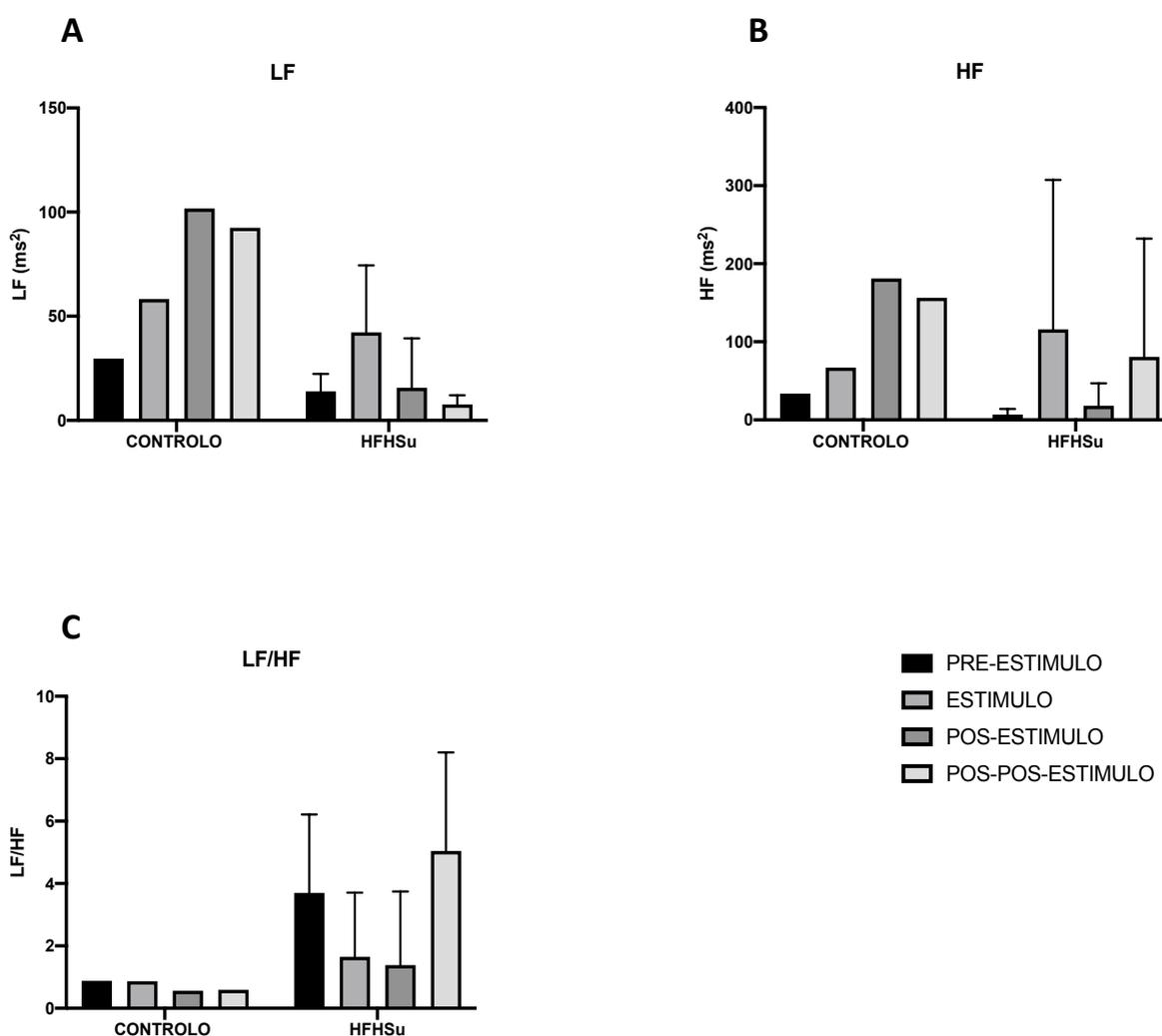


**Figura 49.** – Efeito de uma condição de anoxia no SNA, resultado de uma análise dos parâmetros descritivos das distribuições de intervalos RR. Resultados para os dois grupos de animais em estudo, ao longo do tempo: (A) kurtosis; (B) skewness.

**Análise da VFC no domínio da frequência:**

Na Figura 50 encontram-se apresentadas as médias das densidades de potência para as baixas (LF) e altas frequências (HF) dos sinais RR analisados e o rácio LF/HF para os grupos em estudo, ao longo das aquisições.

Quando analisados os índices de análise no domínio da frequência, nota-se que, no animal saudável, o valor de LF aumenta significativamente, após o estímulo. Nota-se um aumento no momento do estímulo, em relação ao valor tido como basal (pré-estímulo) e esse aumento continua nos segundos imediatamente após a anoxia. Ao fim de 2 minutos (pós-pós-estímulo), ainda permanece em valores mais altos do que os registados antes do estímulo. O mesmo perfil se regista no parâmetro HF.



**Figura 50.** – Efeito de uma condição de anoxia no SNA. Índices calculados no domínio da frequência.

Representação gráfica dos parâmetros utilizados para análise da VFC por exibição da média e respetivo erro (desvio padrão): (A) LF; (B) HF; (C) LF/HF.

Em ratos diabéticos, verifica-se um aumento dos valores de LF e HF ao longo do estímulo, seguido de uma diminuição e progressivo retorno ao basal. Contrariamente, no rato saudável, não se regista um aumento de LF e HF nos segundos imediatos ao estímulo.

O rácio LF/HF é manifestamente superior em animais diabéticos, mas aparenta existir uma manutenção do seu valor ao longo da aquisição, em ambos os grupos de animais. O valor do rácio mantém-se sensivelmente constante ao longo do tempo, sem variações aquando do estímulo ou nos momentos seguintes. Isto é observado no animal saudável e nos animais diabéticos.

O estímulo de anoxia tenderá, então, a não interferir de forma direta com o valor do rácio LF/HF, respeitando o teoricamente esperado, de acordo com a literatura.

Os modelos de análise não linear da VFC perdem significado em sinais de duração reduzida. Uma análise tendo por base os gráficos de Poincaré mostrou ser pouco conclusiva, na medida em que são considerados intervalos de 15 segundos, o que implica um número muito baixo de valores de RR e, portanto, um número muito reduzido de pontos no plano da dispersão de Poincaré.

Os resultados obtidos estão de acordo com outros estudos realizados. Efetivamente, no que a parâmetros de análise de VFC concerne, a anoxia, por oposição a uma condição de normoxia, tende a aumentar a média entre intervalos RR e a aumentar o valor de SDNN e de rMSSD [76].

Uma análise no domínio da frequência, em situações de anoxia, resulta num aumento do valor de HF e de LF, com manutenção do valor do rácio LF/HF [76].

Estes resultados são mais significativos no animal saudável, notando-se que, na patologia metabólica, a resposta a um estímulo não metabólico pode estar ligeiramente prejudicada.

### **Uma exposição repetida ao estímulo apresentará resultados diferentes?**

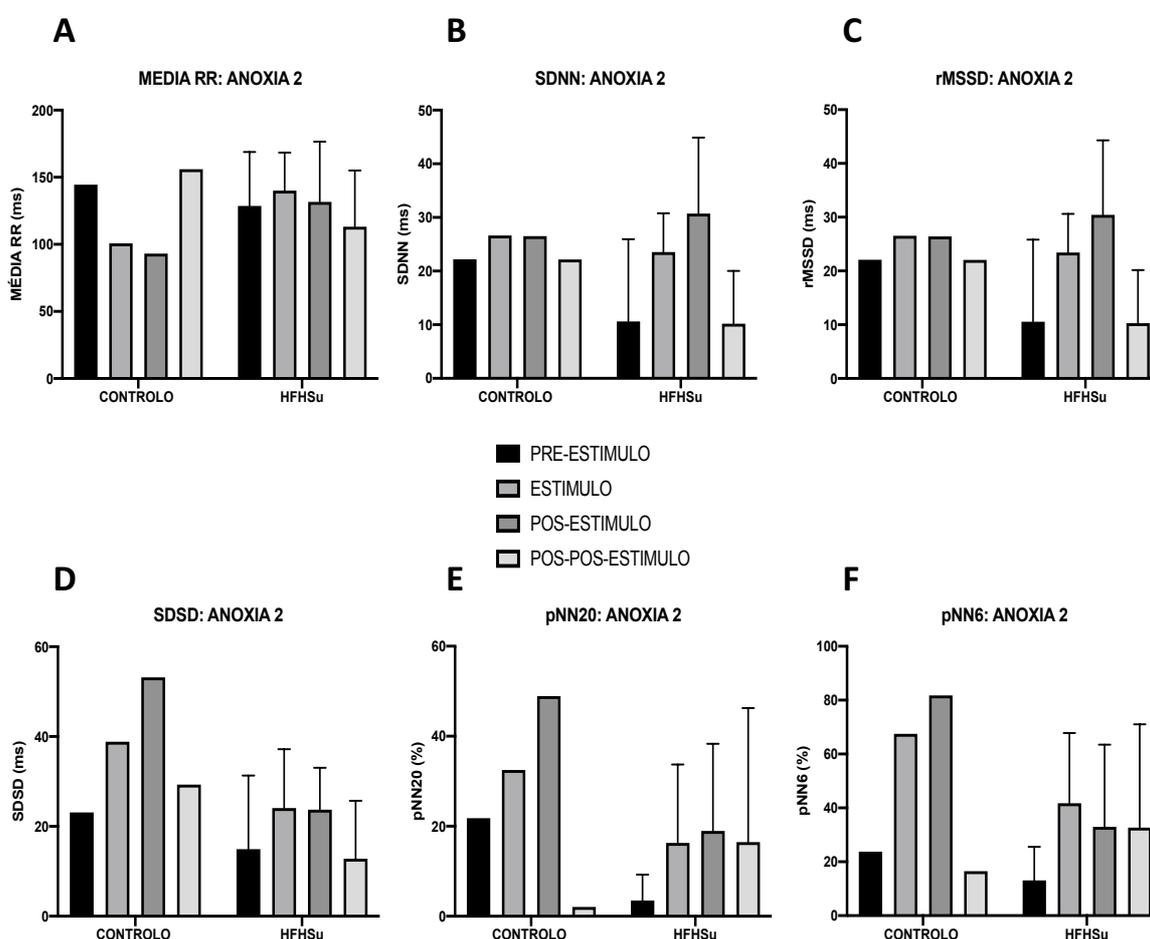
A anoxia foi repetida ao longo da aquisição, ou seja, o mesmo animal foi sujeito a vários momentos de anoxia (sempre com a duração de 15 segundos) ao longo do tempo em que foi adquirido sinal de intervalos RR.

Por forma a verificar se a exposição sucessiva a este estímulo teria algum efeito na VFC e se os animais responderiam, a nível autonómico, de igual modo à primeira ou segunda exposição ao mesmo estímulo, procedeu-se a análise, também, do segundo momento de anoxia a que os animais foram sujeitos.

Foi seguido exatamente o protocolo utilizado na análise do primeiro momento de anoxia.

Registou-se uma ligeira redução da média dos intervalos RR durante e imediatamente após o estímulo, o que contraria o resultado obtido na primeira anoxia. Este resultado pode ser consequência do reforço da anestesia, pela duração temporal mais extensa do procedimento, entre o primeiro e o segundo momento de anoxia.

Os parâmetros de análise da VFC variam de forma correspondente ao sucedido no primeiro momento de estímulo, tanto no rato saudável como nos ratos diabéticos. Na Figura 51 são apresentados os resultados obtidos para o segundo momento de anoxia.



**Figura 51.** – Efeito de patologia metabólica na resposta autonómica a uma estimulação repetida com anoxia.

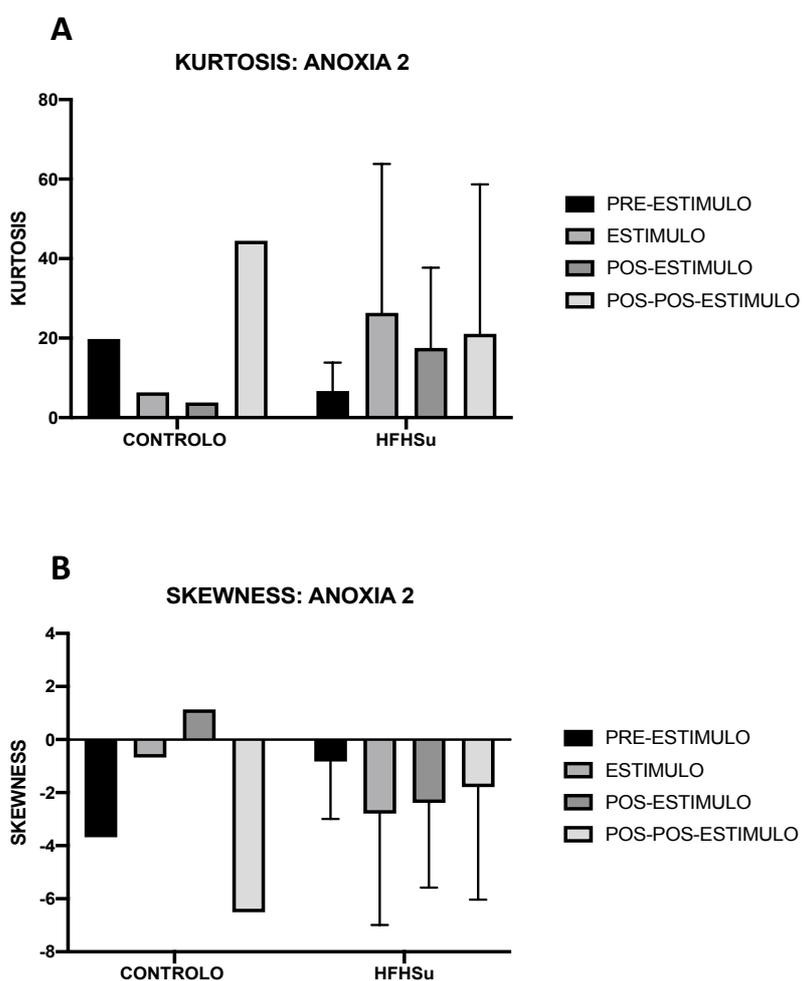
Índices utilizados para análise da VFC: (A) comportamento do índice média RR; (B) índice SDNN; (C) índice rMSSD; (D) índice SDDSD; (E) índice pNN20 e (F) índice pNN6.

Uma análise descritiva da distribuição dos valores de RR ao longo desta segunda aquisição apresenta resultados semelhantes aos obtidos no primeiro

momento de anoxia. Os valores obtidos para os parâmetros de análise da distribuição dos valores de RR são apresentados na Figura 52.

No animal sem patologia, ocorre uma diminuição progressiva da *kurtosis* após o estímulo de anoxia, acompanhada por um aumento, 2 minutos após o estímulo. O valor absoluto de *skewness* tende a diminuir após uma condição de anoxia e é mais baixo no período imediatamente após o estímulo.

Em animais com patologia metabólica, verifica-se um aumento do valor de *kurtosis* nos instantes após a anoxia. A distribuição tende a ser mais assimétrica após o estímulo, e, ao fim de 2 minutos após o estímulo, a simetria tende a reduzir, notado por redução do valor de *skewness*, aproximando-se do valor pré-estímulo.



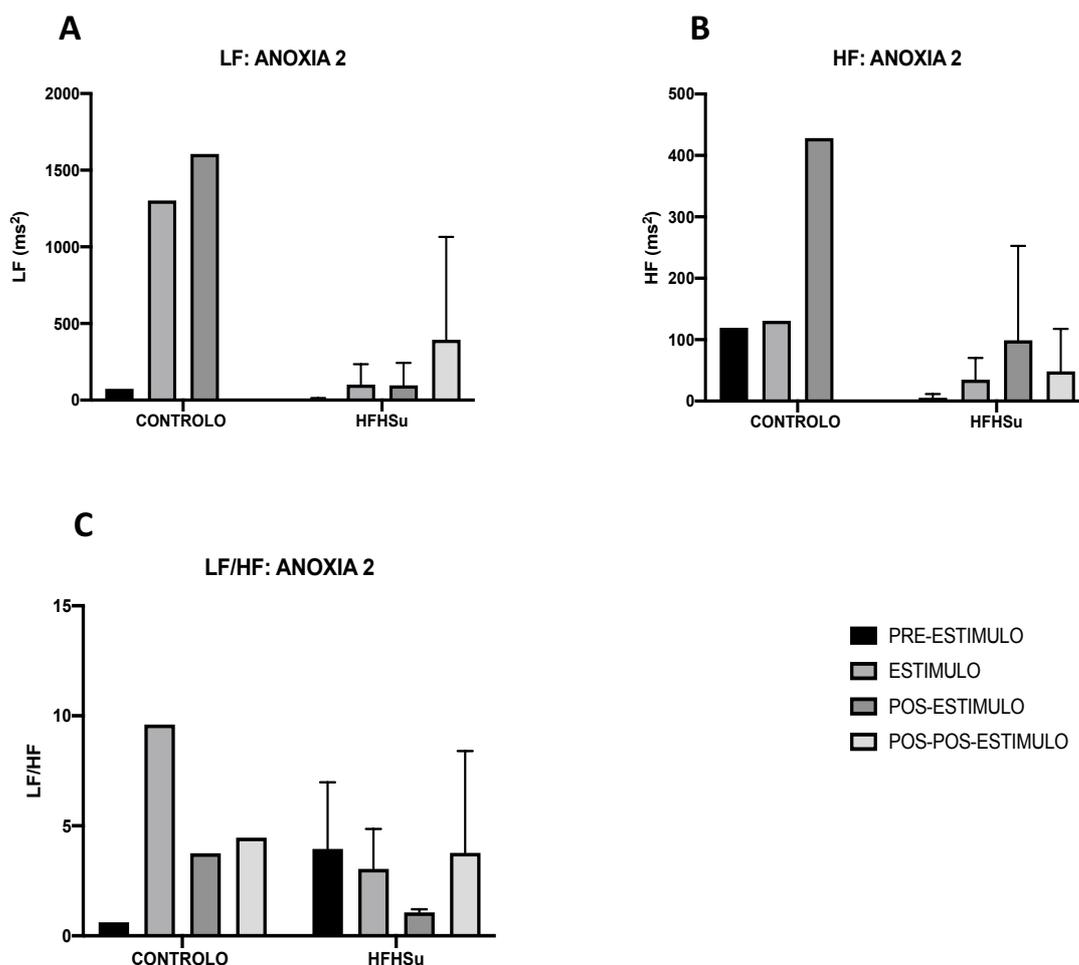
**Figura 52.** – Efeito de um segundo momento de anoxia no SNA de ratos com e sem patologia metabólica (HFHSu e CONTROLO, respetivamente).

Análise de parâmetros descritivos das distribuições de intervalos RR ao longo do tempo, antes, durante e após o momento do estímulo: (A) *kurtosis*; (B) *skewness*.

Quando analisados os índices de análise no domínio da frequência, apresentados na Figura 53, nota-se que, em no animal saudável, o valor de LF aumenta significativamente, após o estímulo. Nota-se um aumento no momento do estímulo, em relação ao valor tido como basal (pré-estímulo) e esse aumento continua nos segundos imediatamente após a anoxia. Ao fim de 2 minutos (pós-pós-estímulo), o valor de LF reduz significativamente. O mesmo perfil se regista no parâmetro HF.

Para animais modelos de Diabetes tipo 2 em humanos (grupo HFHSu), o valor de LF tende a apresentar um valor mais elevado passados 2 minutos do estímulo. O valor HF aumenta imediatamente após o estímulo.

Conclui-se, então, que o perfil de variação de LF e HF é semelhante no animal saudável e nos animais patológicos parecendo, contudo, que este perfil se regista mais tardiamente em animais patológicos. O mesmo se registou no primeiro momento de anoxia.

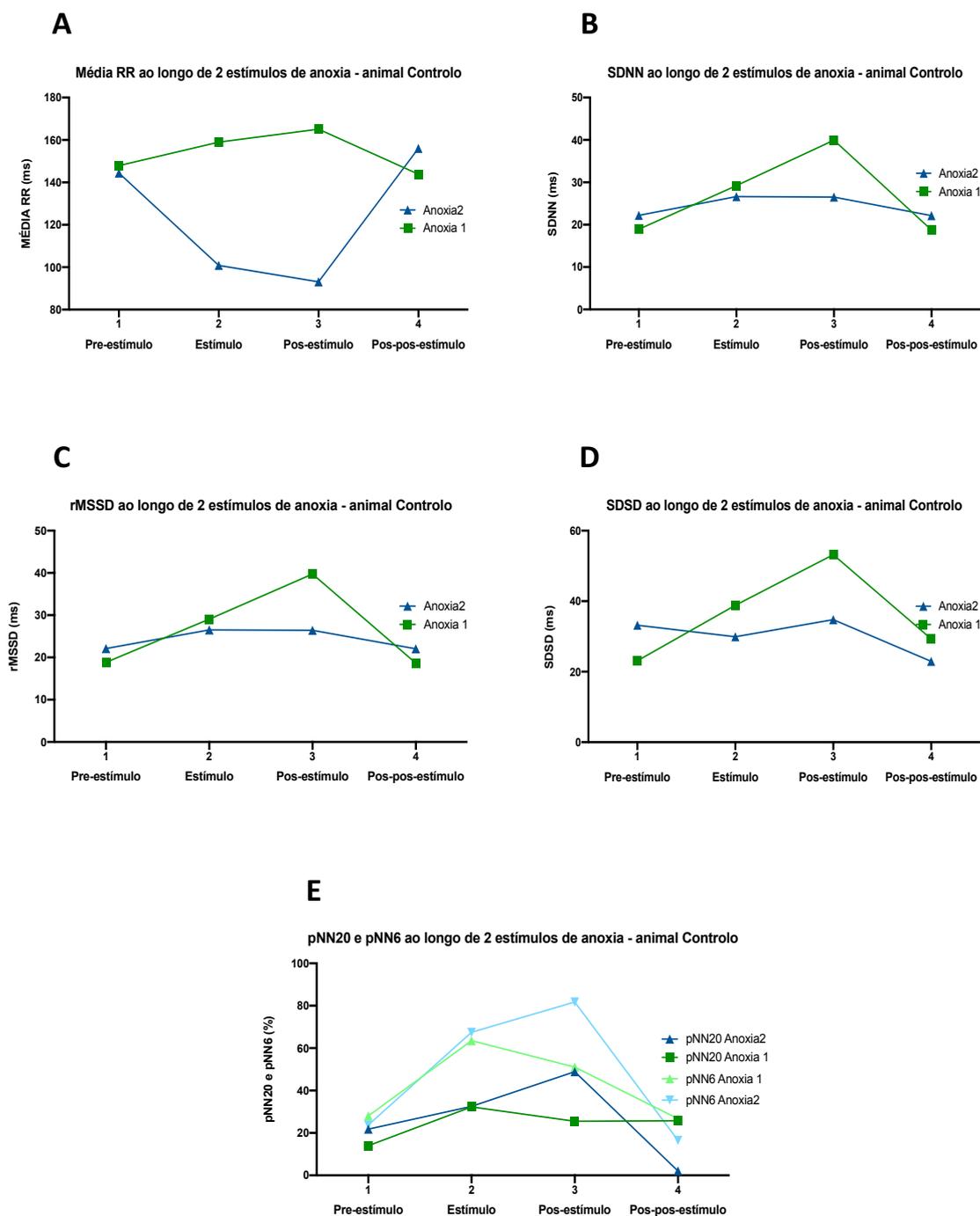


**Figura 53.** – Efeito de uma condição repetida de anoxia no SNA. Índices calculados no domínio da frequência.

Representação gráfica dos parâmetros utilizados para análise da VFC no domínio da frequência: (A) LF; (B) HF; (C) LF/HF.

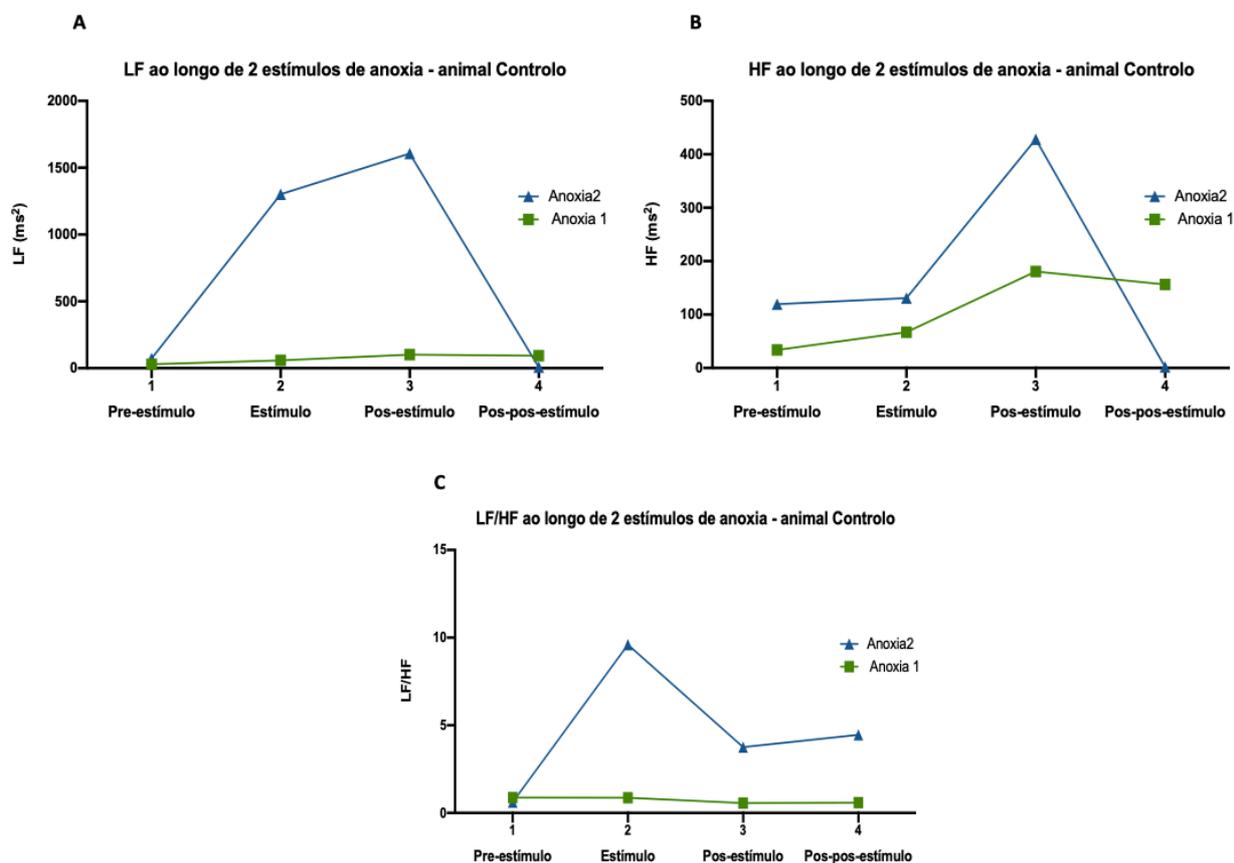
Procurando perceber como os índices de análise da VFC variam, no mesmo animal, entre os dois momentos de anoxia distintos, apresenta-se, na Figura 54, o comportamento dos vários índices, para o mesmo animal controle (sem patologia) ao longo dos dois momentos de estímulo por uma condição de anoxia.

Nota-se uma diferença significativa entre os dois momentos de estímulo apenas no parâmetro média RR. Para o segundo momento de anoxia, este parâmetro tende a diminuir nos instantes aquando e após o estímulo, enquanto que, no primeiro momento de anoxia, se regista um aumento do parâmetro nestes intervalos. Os restantes parâmetros tendem a variar de uma forma aproximadamente semelhante ao longo dos dois momentos de anoxia. Tal como já mencionado, esta divergência entre os dois momentos de anoxia para o índice média RR pode ser resultado de um reforço, entre as anoxias, do anestésico, o qual tem implicações a nível da FC e, portanto, da duração dos intervalos RR.



**Figura 54.** – Comportamento dos índices de análise da VFC em dois momentos de anoxia consecutivos (Anoxia 1 e Anoxia 2) para o rato Wistar controle. Para o animal sujeito a uma dieta standard e sem patologia metabólica, tem-se os parâmetros: (A) média RR; (B) SDNN; (C) rMSSD; (D) SDSD; (E) pNN20 e pNN6.

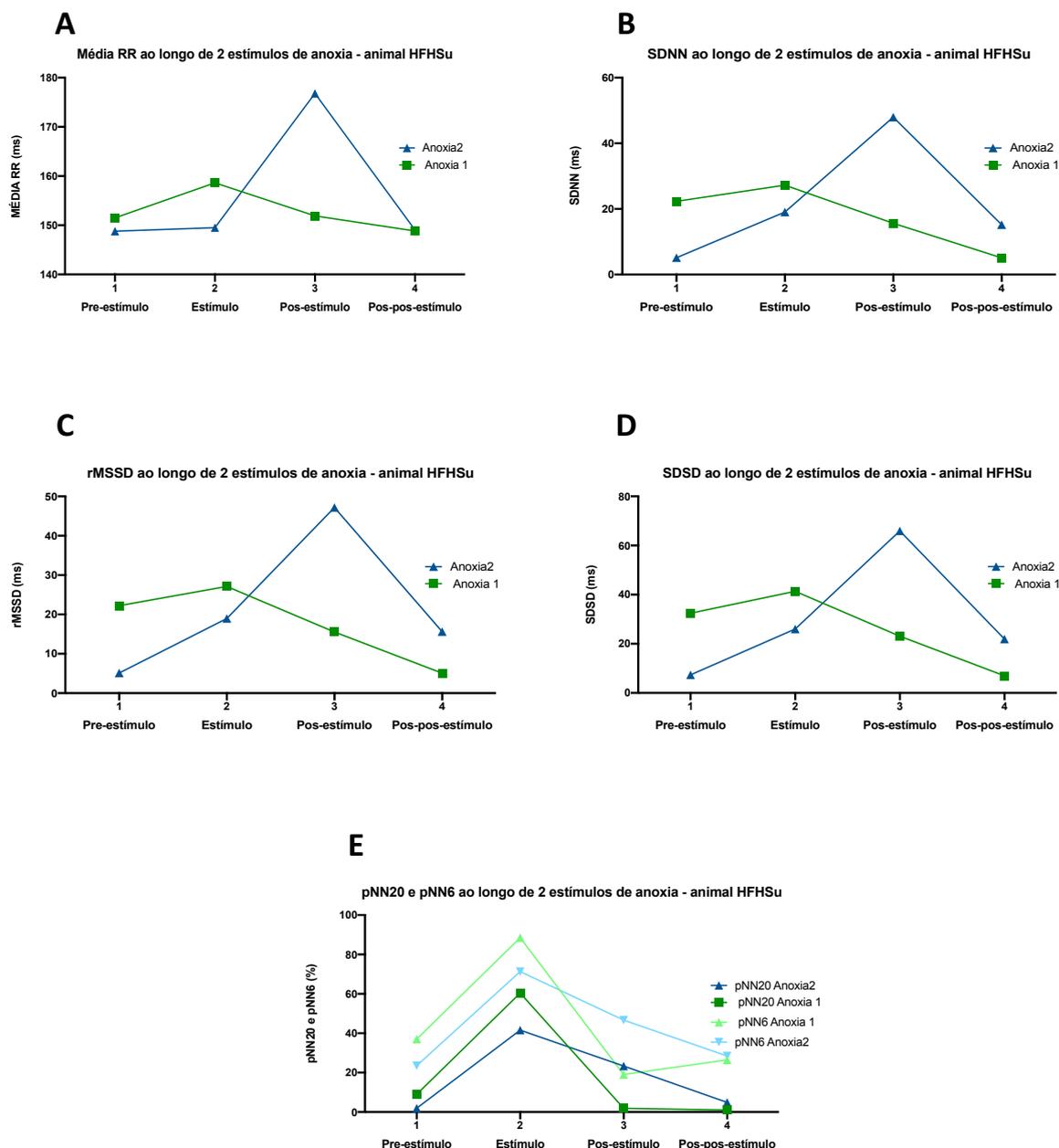
Na Figura 55 são apresentados os comportamentos, nos dois momentos de anoxia, dos índices de análise da VFC no domínio da frequência.



**Figura 55.** – Comportamento dos índices de análise da VFC no domínio da frequência, em dois momentos de anoxia consecutivos (Anoxia 1 e Anoxia 2) para o rato Wistar controlo. Tem-se: (A) índice LF; (B) índice HF; (C) rácio LF/HF.

Apesar de o primeiro momento de anoxia (Anoxia 1) tender a apresentar valores mais baixos dos índices LF, HF e LF/HF, nota-se que o perfil de variação destes índices não diverge muito entre o primeiro e o segundo momento de estímulo.

Procedeu-se do mesmo modo para um animal com patologia, procurando compreender se existe variações na resposta autonómica entre o primeiro e o segundo momento de anoxia numa condição de patologia metabólica. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 56.



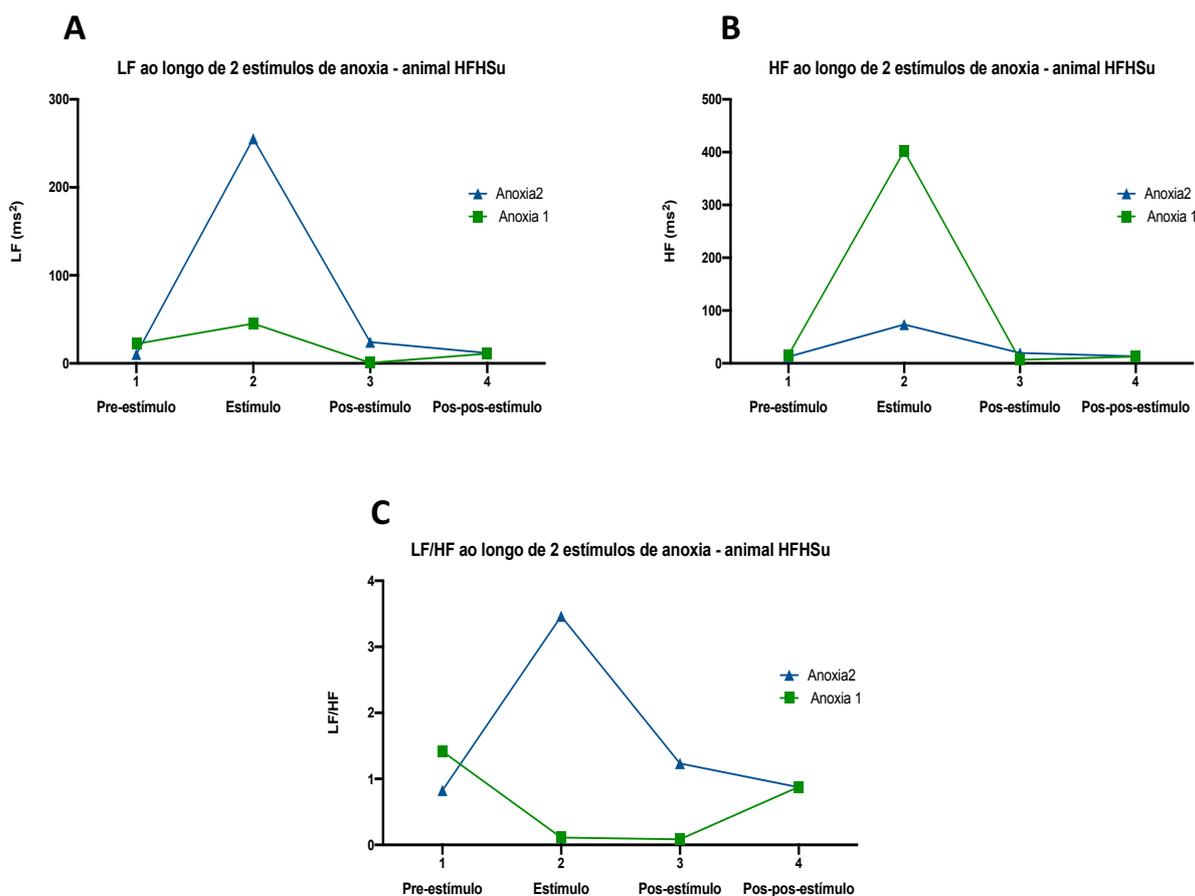
**Figura 56.** – Comportamento dos índices de análise da VFC em dois momentos de anoxia consecutivos (Anoxia 1 e Anoxia 2) para um rato Wistar sujeito a uma dieta HFHSu. Apresentação dos índices, ao longo do tempo: (A) média RR; (B) SDNN; (C) rMSSD; (D) SDSD; (E) pNN20 e pNN6.

O animal parece responder de uma forma mais imediata, nomeadamente, por aumento dos parâmetros média RR, SDNN, rMSSD e SDSD no exato momento do estímulo, no primeiro momento de anoxia (Anoxia 1). Na repetição do estímulo (Anoxia 2) a resposta, por parte do SNA do rato, parece ser mais lenta e atrasada, registando-se um aumento dos parâmetros anteriormente mencionados apenas passados 15 segundos do estímulo (momento Pós-Estímulo).

Tal como já mencionado, esta divergência entre os dois momentos de anoxia pode ser resultado de um reforço, entre as anoxias, do anestésico.

De uma forma geral, o perfil de variação do comportamento dos índices tende a ser semelhante em ambos os momentos de anoxia, registando-se um aumento da VFC após o estímulo.

De igual modo, procedeu-se ao estudo do comportamento dos índices de análise da VFC no domínio da frequência, em ambos os momentos de anoxia. Esses resultados são apresentados na Figura 57.



**Figura 57.** – Comportamento dos índices de análise da VFC no domínio da frequência, em dois momentos de anoxia consecutivos (Anoxia 1 e Anoxia 2) para um rato Wistar com patologia metabólica.

Tem-se: (A) índice LF; (B) índice HF; (C) rácio LF/HF.

Nota-se que, no primeiro momento de anoxia, o valor de LF é mais elevado, ao longo de toda a aquisição considerada, enquanto que o parâmetro HF é mais reduzido, em relação ao segundo momento de estímulo. No entanto, o perfil de variação é bastante semelhante entre ambos os momentos.

No segundo momento de anoxia, verifica-se um aumento do valor de LF/HF no momento do estímulo, contrariamente ao que sucede na primeira condição de anoxia.

Conclui-se, então, que o animal com patologia metabólica apresenta uma resposta autonómica mais semelhante à resposta desencadeada pelo animal saudável, a uma condição de anoxia, quando o estímulo é repetido. No primeiro momento de anoxia, o animal patológico parece apresentar uma resposta tardia e mais divergente da resposta de um animal saudável tido como referência.

### 5.2.2. A VFC no estímulo de Glicose

Estudos revelam que um aumento das concentrações de glicose e insulina no plasma está associado a respostas simpáticas dependentes do estado de tolerância à insulina do indivíduo em causa [7].

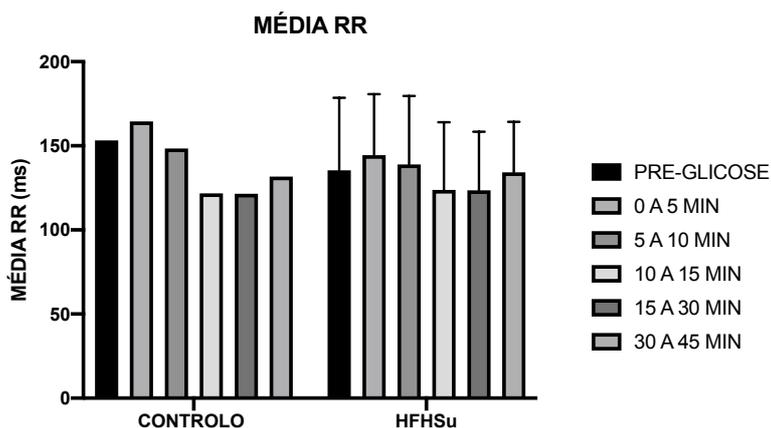
Com o intuito de perceber como a patologia metabólica, induzida por uma dieta hipercalórica com consumo aumentado de açúcar, afeta a resposta autonómica a um estímulo metabólico, procedeu-se a uma análise da VFC ao longo de vários períodos temporais antes, durante e após um aumento da concentração de glicose no sangue. Na Tabela 8 são apresentados os números de aquisições estudadas por forma a perceber como a resposta a este estímulo varia em função de uma condição de patologia metabólica.

**Tabela 8.** – Número de aquisições consideradas no estudo, para cada grupo de animais, em condição de estímulo de glicose.

	CONTROLO	HFHSu
N.º de aquisições	1	3
Total de aquisições	4	

Tanto no modelo animal saudável (grupo Controlo) como em modelos animais com resistência insulínica (grupo HFHSu), após o estímulo de glicose (aproximadamente, 10 minutos após o estímulo), regista-se uma diminuição da média dos intervalos RR, o que implicará um aumento da FC.

Um aumento da FC implica um maior número de batimentos cardíacos num mesmo intervalo de tempo, o que origina um menor intervalo temporal entre batimentos, logo, um menor intervalo entre as ondas R de cada batimento e, portanto, um menor valor da média RR. Na Figura 58 é possível verificar a variação da média RR perante o estímulo de glicose, para ambos os grupos de animais em estudo.



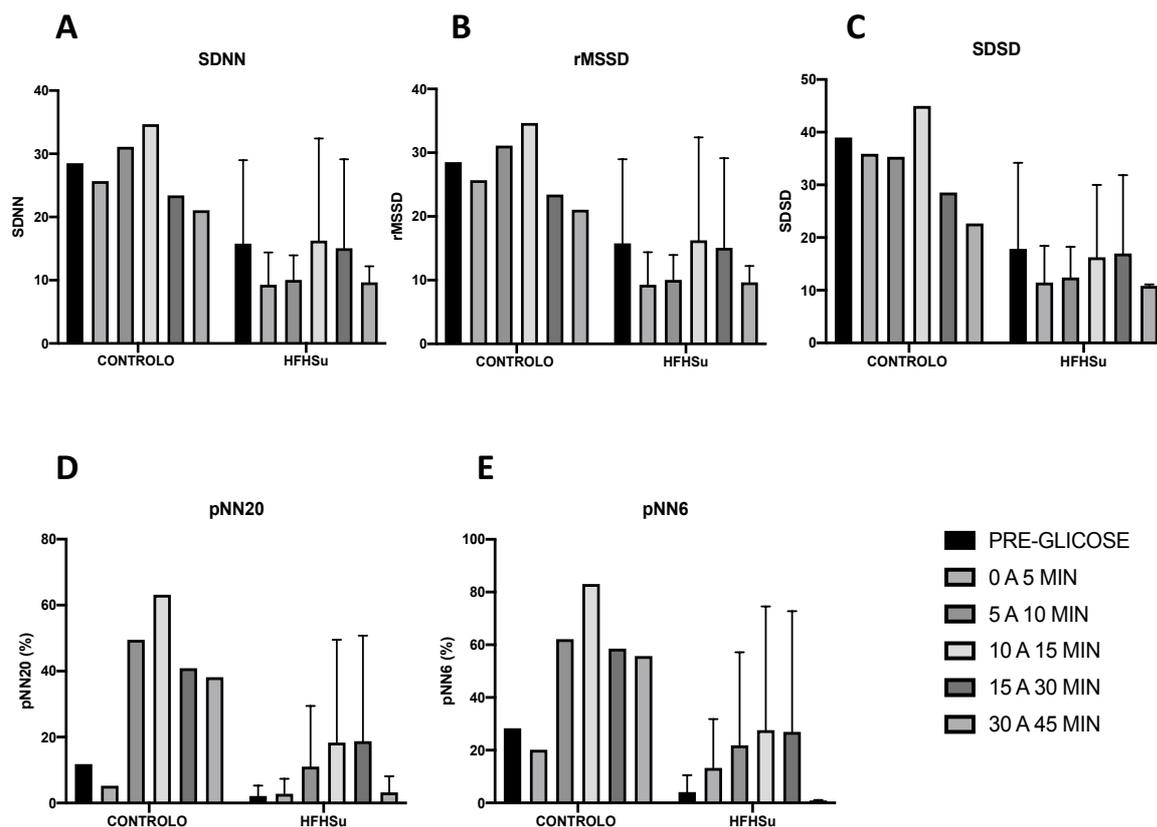
**Figura 58.** – Comportamento do valor da média RR (em milissegundos) ao longo do tempo, aquando do estímulo de glicose, para o grupo de animais saudáveis (controle) e para o grupo de animais resistentes à insulina (HFHSu).

No animal de controlo, saudável, regista-se, imediatamente a seguir ao estímulo, um ligeiro aumento da duração dos intervalos RR (redução da FC), seguido de uma diminuição dos intervalos RR (aumento da FC). Aos 30 minutos o valor de RR tende a aproximar-se dos valores basais, ou seja, dos valores antes do estímulo, designado como Pré-Glicose.

No grupo de animais resistentes à insulina, também se nota um ligeiro aumento da média RR imediatamente a seguir ao estímulo, seguido de uma diminuição da média dos intervalos RR. Aos 30 minutos o valor de RR tende a aproximar-se dos valores basais.

No que à VFC concerne, a resposta é distinta entre o animal saudável e os animais insulicamente resistentes. Numa resposta imediata a um aumento da concentração de glicose no sangue, o rato saudável reage através do aumento da VFC, notado pelo aumento dos parâmetros SDNN, rMSSD e SDSD. Por outro lado, os animais resistentes à insulina, modelos da Diabetes tipo 2, Obesidade ou Síndrome Metabólica em humanos, respondem através de uma diminuição dos valores destes parâmetros, logo, através de uma redução da VFC. Estes resultados são apresentados na Figura 59.

Todos os animais considerados no grupo resistente à insulina, grupo HFHSu, apresentam a mesma idade e foram sujeitos à mesma dieta e, portanto, apresentarão todos o mesmo estado de tolerância à glicose e de resistência à insulina.



**Figura 59.** – Efeito de uma dieta hipercalórica na resposta ao estímulo de Glicose, resultado de uma análise da VFC no domínio do tempo.

Representação gráfica dos índices utilizados para análise da VFC no grupo de animais sujeito a uma dieta normal e no grupo exposto a uma dieta hipercalórica com consumo aumentado de açúcar: (A) SDNN; (B) rMSSD; (C) SDSD; (D) pNN20; (E) pNN6.

Considerando o animal tido como controlo, regista-se, imediatamente a seguir ao estímulo, uma diminuição dos valores de SDNN, rMSSD, SDSD (redução da VFC), seguida de um aumento destes índices nos minutos seguintes. O aumento destes valores ocorre, após a tal diminuição no momento do estímulo, cerca de 5 minutos após o estímulo (intervalo 5 a 10 minutos).

No grupo de animais resistentes à insulina, também se nota um ligeiro decréscimo dos valores dos índices SDNN, rMSSD, SDSD no momento do estímulo, mas este decréscimo é pouco significativo. Neste caso, apenas passados cerca de 10 minutos após o estímulo se regista um aumento dos valores destes parâmetros.

Pode-se deduzir, então, que, no animal saudável, a resposta ao aumento da concentração de glicose no sangue ocorre de forma imediata e com uma duração temporal de cerca de 30 minutos, altura a partir da qual os índices de VFC retornam aos seus valores normais. Esta resposta é tipicamente um aumento da FC e um aumento da VFC.

Para animais resistentes à insulina, a resposta ao aumento da concentração de glicose é menos evidente e mais tardia, não respondendo de imediato ao estímulo, mas apenas passados cerca de 10 a 15 minutos. Esta resposta caracteriza-se, igualmente, por um aumento da FC e um aumento da VFC.

### **Análise da VFC no domínio da frequência:**

Para além da recolha de parâmetros de análise no domínio do tempo, para averiguar sobre como a VFC e, portanto, como a resposta do SNA varia em função de um estímulo metabólico, é igualmente relevante uma análise das séries de intervalos RR no domínio da frequência. Estes resultados são apresentados na Figura 60, através dos parâmetros LF, HF e LF/HF.

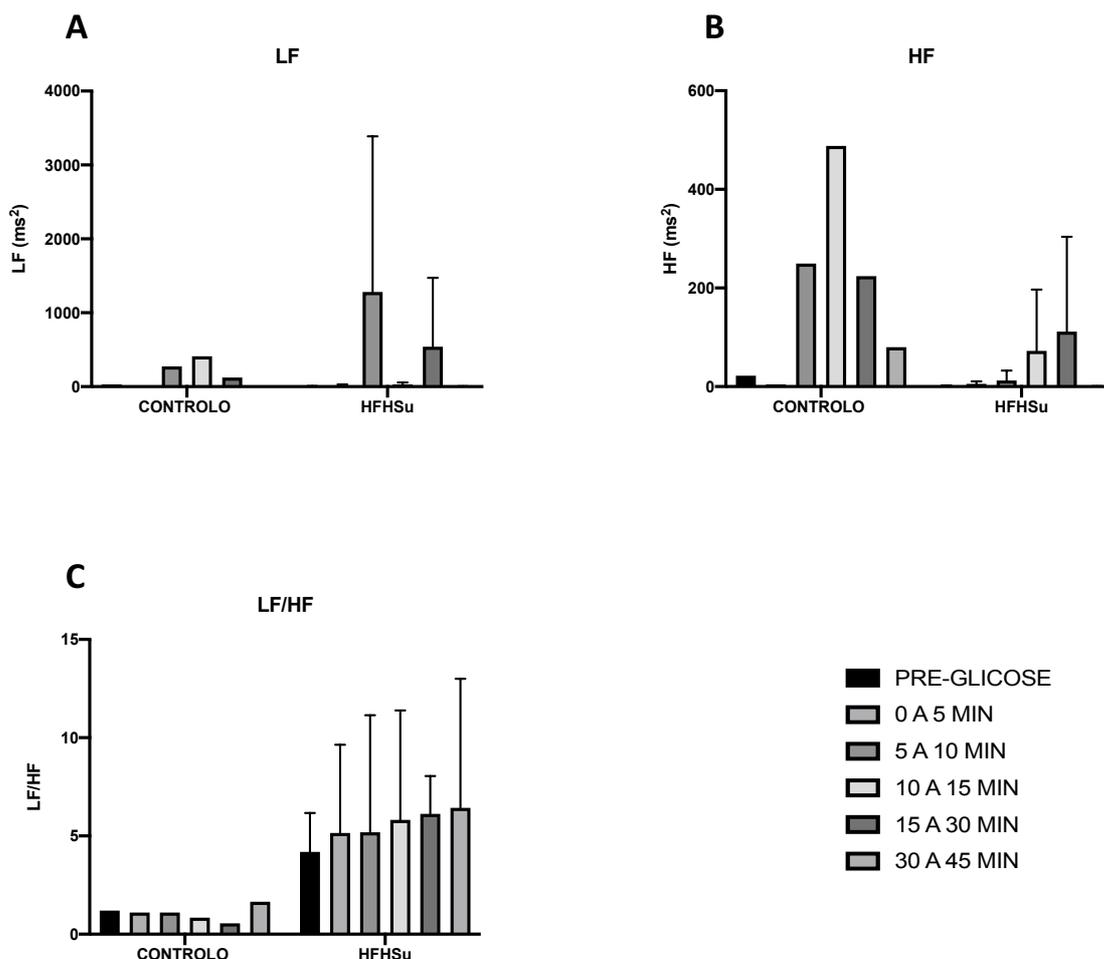
Na situação de estímulo, ou seja, da injeção intravenosa de glicose, regista-se um aumento do parâmetro LF passados, aproximadamente, 5 minutos do momento do estímulo, em ambos os grupos de animais. Este aumento parece ser bastante mais significativo em animais com patologia metabólica (grupo HFHSu). Os valores deste parâmetro nos intervalos Pré-Glicose, 0 a 5 minutos e 30 a 45 minutos são bastante reduzidos, em ambos os grupos, sendo apresentados na Figura 60 (A).

Ao fim de 30 minutos após o estímulo, os valores de LF parecem ser repostos para valores próximos do estado basal, ou seja, do estado Pré-Glicose, para o animal saudável e para os animais com patologia metabólica.

O índice HF varia de forma semelhante, apresentando um aumento ao fim de 5 minutos após o estímulo e voltando a um valor mais baixo e mais próximo do valor basal, passados cerca de 30 minutos, para ambos os grupos de animais.

O rácio LF/HF permanece sensivelmente constante no momento do estímulo, sem grande diferença em relação ao estado basal, para o roedor saudável.

Para animais com patologia metabólica, Diabetes tipo 2, o rácio LF/HF parece aumentar ligeiramente após o estímulo e continuar relativamente alto ao longo dos 45 minutos seguintes.

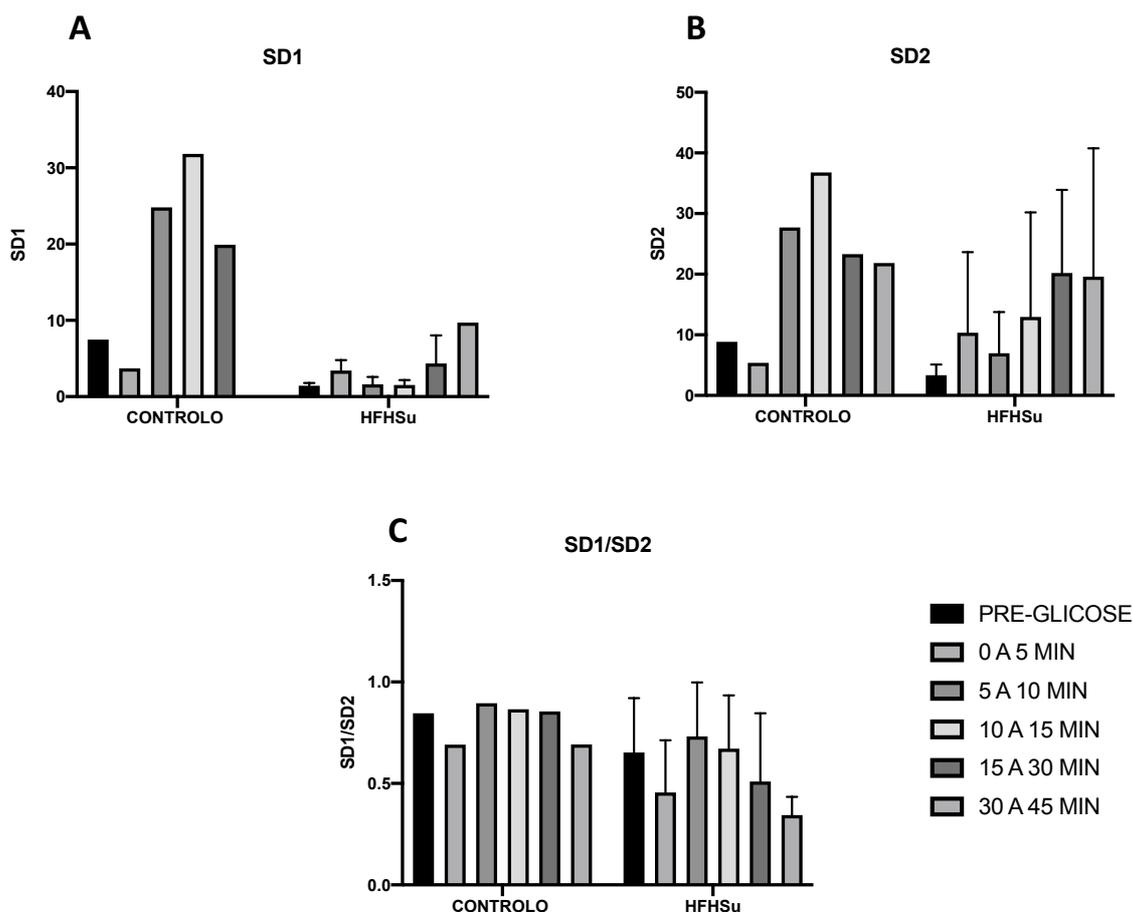


**Figura 60.** – Efeito de uma condição de aumento dos níveis de glicose no sangue na resposta do SNA. Índices calculados no domínio da frequência.

Representação gráfica dos parâmetros utilizados para análise da VFC no domínio da frequência: (A) LF; (B) HF; (C) LF/HF.

### Análise da VFC por métodos não lineares no domínio do tempo:

No que à forma da dispersão de Poincaré concerne, ao longo da aquisição, em ambos os grupos de animais em estudo, não se registam diferenças. A grande maioria dos animais apresenta, ao longo de todos os segmentos temporais analisados, um gráfico de Poincaré com uma forma de Torpedo. Assim, acredita-se que uma análise quantitativa dos gráficos de Poincaré, com recurso aos parâmetros SD1, SD2 e SD1/SD2 possa ser mais relevante. Estes resultados são apresentados na Figura 61.



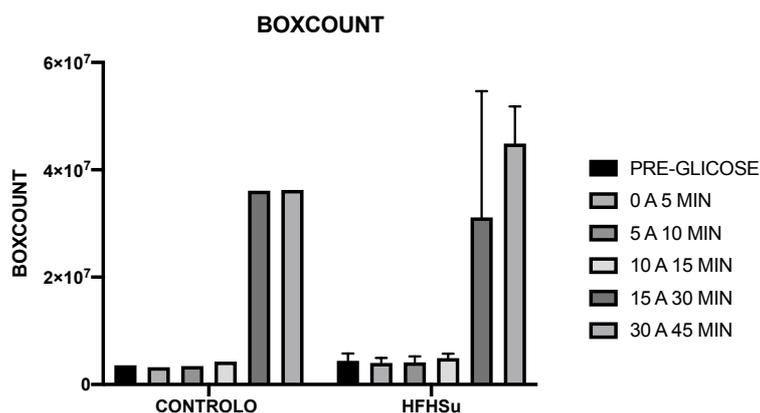
**Figura 61.** – Efeito do aumento dos níveis de glicose no sangue no SNA, pelos índices de análise das dispersões de Poincaré. A saber: (A) SD1; (B) SD2; (C) rácio SD1/SD2.

Quer o parâmetro SD1, quer o parâmetro SD2 aumentam passados cerca de 5 a 10 minutos após o estímulo, considerando o rato saudável, sem patologia metabólica. Este parâmetro atinge um valor máximo no intervalo que dista entre 10 a 15 minutos do estímulo e retorna a um valor próximo do basal ao fim de 30 a 45 minutos após o estímulo.

Para o grupo de ratos diabéticos, nota-se um aumento dos parâmetros SD1 e SD2 ao fim de 15 a 30 minutos após o estímulo. Este aumento acontece muito mais tardiamente do que no rato controlo.

O parâmetro SD1/SD2 permanece aproximadamente constante ao longo da aquisição, tanto no animal controlo (grupo Controlo), como nos animais diabéticos (grupo HFHSu), registando-se, apenas, em ambos os grupos, uma ligeira diminuição aquando do estímulo.

Da análise das dispersões de Poincaré pode, ainda, ser calculado o índice *boxcount*. Os resultados obtidos para este parâmetro, para ambos os grupos de animais, são apresentados na Figura 62.



**Figura 62.** – Representação da variação do parâmetro *boxcount*, em momentos antes, durante e após um estímulo por aumento dos níveis sanguíneos de glicose. Resultados de uma análise do gráfico de Poincaré, para um animal controlo e um animal com patologia metabólica.

O parâmetro *boxcount* apresenta um comportamento semelhante entre o animal sem patologia e os animais com patologia metabólica. Este parâmetro apresenta um valor que se mantém sensivelmente constante ao longo do estímulo e semelhante ao estado basal, notando-se um aumento significativo do valor de *boxcount* quando findos cerca de 15 minutos após o estímulo.

Do estudo destes resultados obtidos após análise das dispersões de Poincaré dos vários animais, pode-se inferir que os parâmetros SD1 e SD2 se alteram de uma forma mais rápida, aquando de uma situação de estímulo metabólico, e que o parâmetro *boxcount* registará alterações mais tardias.

Uma análise estatística dos resultados apresentados teria pouco rigor e pouco valor científico, pela dimensão reduzida da amostra. Assim, toda a análise foi realizada através de observação direta e cálculos relativamente simples de diferenças de valores.

Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura. O estímulo de glicose tem como consequência um aumento da resposta simpática e um decréscimo da resposta parassimpática [7]. Sabe-se que a resposta simpática é tipicamente excitatória e imediata, respondendo através do aumento da FC.

Num estímulo de glicose, indivíduos saudáveis respondem através do aumento da FC, sem modificação significativa da VFC. Por outro lado, indivíduos com Síndrome Metabólica respondem através do aumento da atividade simpática e decréscimo do tónus parassimpático, o que sugere um desequilíbrio no

SNA como consequência de uma situação de hiperglicemia e hiperinsulinemia [7].

### 5.3. Estudo da VFC no repouso: animais sujeitos a bloqueio cirúrgico do NSC

Procurando avaliar como o bloqueio cirúrgico do NSC afeta a resposta autonómica numa condição basal, sem exposição a um estímulo específico, procedeu-se a uma análise da VFC ao longo de segmentos temporais de alguns minutos para animais com e sem patologia metabólica, com NSC intacto e com denervação do NSC.

Com o intuito de compreender como a denervação do NSC afeta a resposta do SNA e, portanto, como afeta a patologia metabólica enquanto desencadeadora de neuropatia autonómica, foram estudados quatro grupos distintos de animais.

Na Tabela 9 são apresentados os números de aquisições estudadas por forma a perceber como a resposta a este estímulo varia em função de uma condição de patologia metabólica.

**Tabela 9.** – Número de aquisições consideradas em cada grupo de animais, para o estudo do bloqueio cirúrgico do nervo do seio carotídeo (NSC) no sistema nervoso autónomo.

	CONTROLO	HFat	CONTROLO DEN	HFat DEN
N.º de aquisições	6	2	3	4
<b>Total de aquisições</b>	15			

#### **Análise da VFC no domínio do tempo:**

Os valores médios dos parâmetros utilizados para análise da VFC são apresentados, para os vários grupos de animais em estudo, na Figura 63.

Numa condição de patologia metabólica em estado inicial, como um estado de pré-Diabetes, representado pelo grupo HFat, nota-se um ligeiro aumento da duração dos intervalos RR, o que está relacionado com uma redução da FC, por comparação a uma condição saudável, representada pelo grupo Controlo.

Após a resseção cirúrgica do NSC em animais com patologia, grupo HFat DEN, nota-se uma compensação do aumento da duração dos intervalos RR. Este grupo de animais apresenta um valor médio de duração dos intervalos RR mais baixo do que o grupo HFat, o que poderá ser indicador de maior semelhança ao grupo Controlo.

Para os grupos Controlo e Controlo DEN, que representam grupos de animais saudáveis com NSC intacto e sujeitos a resseção do NSC, respetivamente, os valores de intervalos RR são semelhantes entre eles.

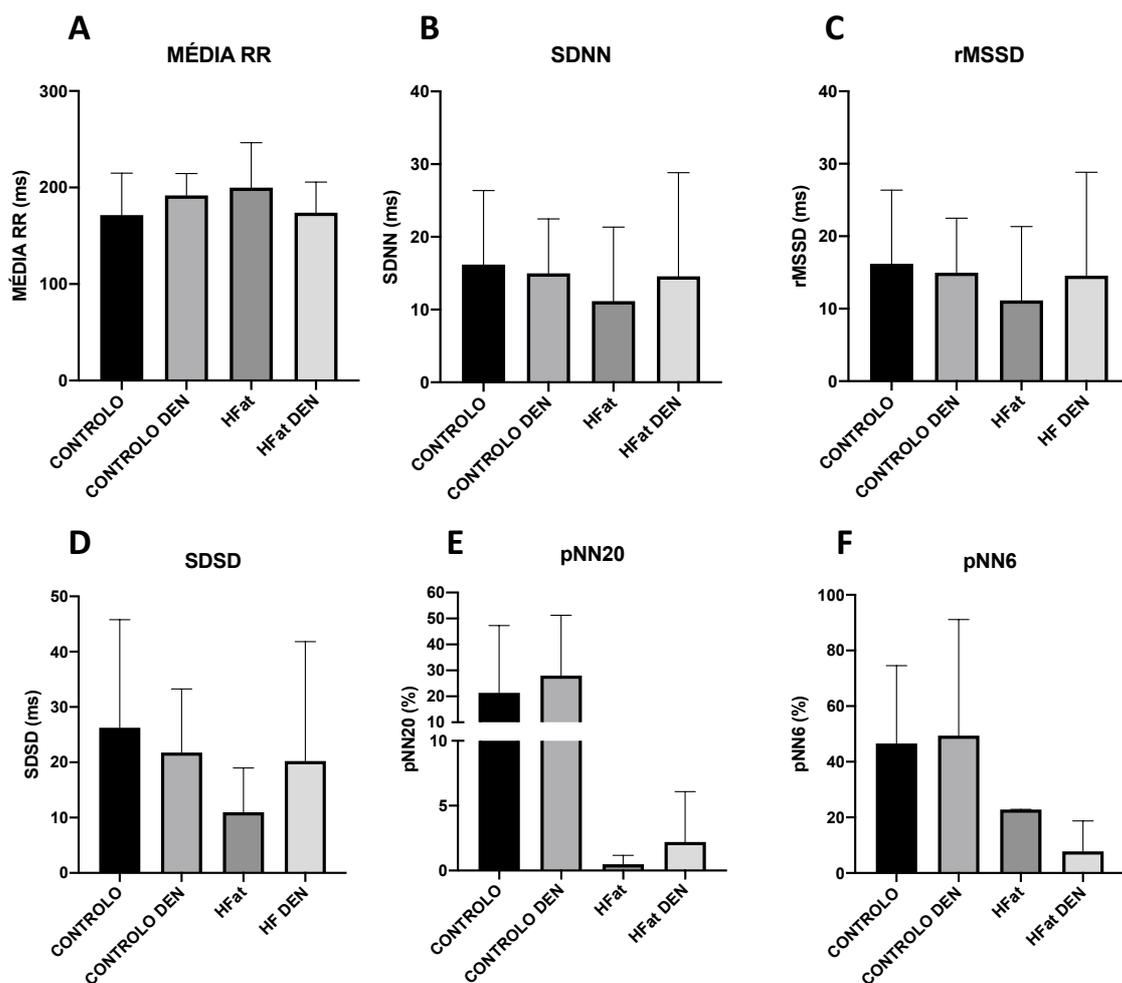
Os parâmetros de análise da VFC parecem estar reduzidos na patologia metabólica, grupo HFat, tal como previamente descrito na secção 5.1. Esta afirmação é válida para os índices SDNN, rMSSD, SDSD. O grupo HFat DEN apresenta valores médios para estes índices mais elevados e, portanto, mais próximos dos valores do grupo Controlo. O grupo Controlo DEN não apresenta grandes variações dos valores destes parâmetros, em relação ao grupo Controlo.

Os índices pNN20 e pNN6 tendem a ser mais baixos numa condição de distúrbio metabólico (grupo HFat). O grupo HFat DEN apresenta um valor médio de pNN20 e de pNN6 reduzido, em relação aos grupos Controlo e Controlo DEN. Entre os grupos Controlo e Controlo DEN as diferenças destes índices não são significativas, apresentando valores bastante próximos entres os dois grupos.

Analisando a distribuição dos valores de RR ao longo da aquisição, nota-se, em animais controlo com NSC intacto, um valor absoluto mais reduzido de *kurtosis* e de *skewness*.

Os roedores expostos a uma dieta hipercalórica, sem interferência no NSC (grupo HFat), têm tendência para apresentar uma distribuição do sinal RR com pico mais pronunciado e com maior assimetria, afastando-se mais de uma distribuição normal do que em animais controlo.

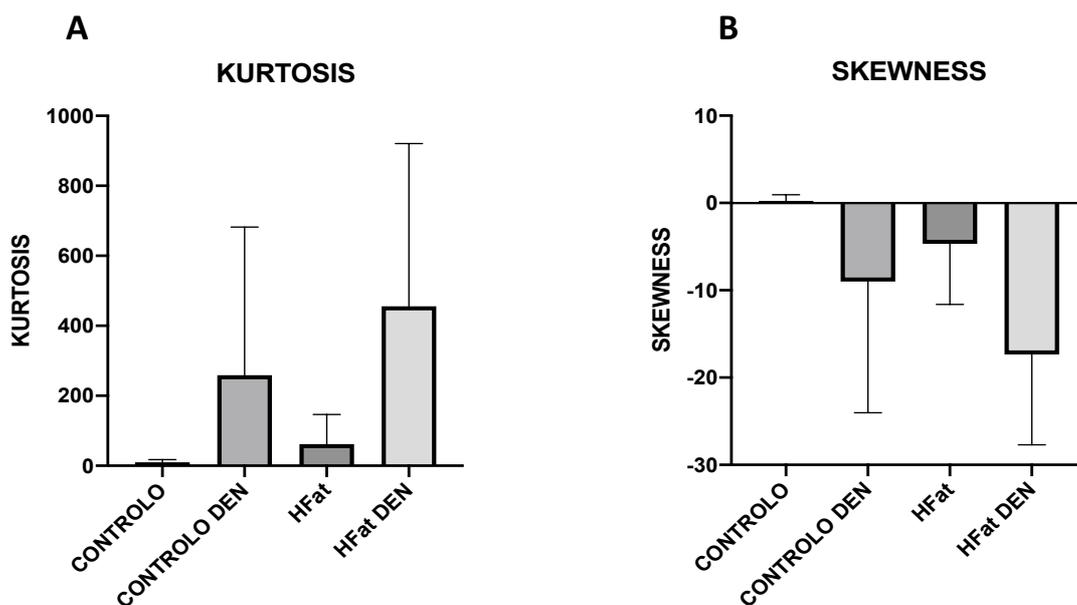
Os animais sujeitos a resseção do NSC apresentam uma distribuição do sinal RR com pico mais pronunciado e com maior assimetria, por comparação aos animais do grupo Controlo sem alteração no NSC.



**Figura 63.** – Efeito da denervação do NSC no SNA, resultado de uma análise da VFC no domínio do tempo.

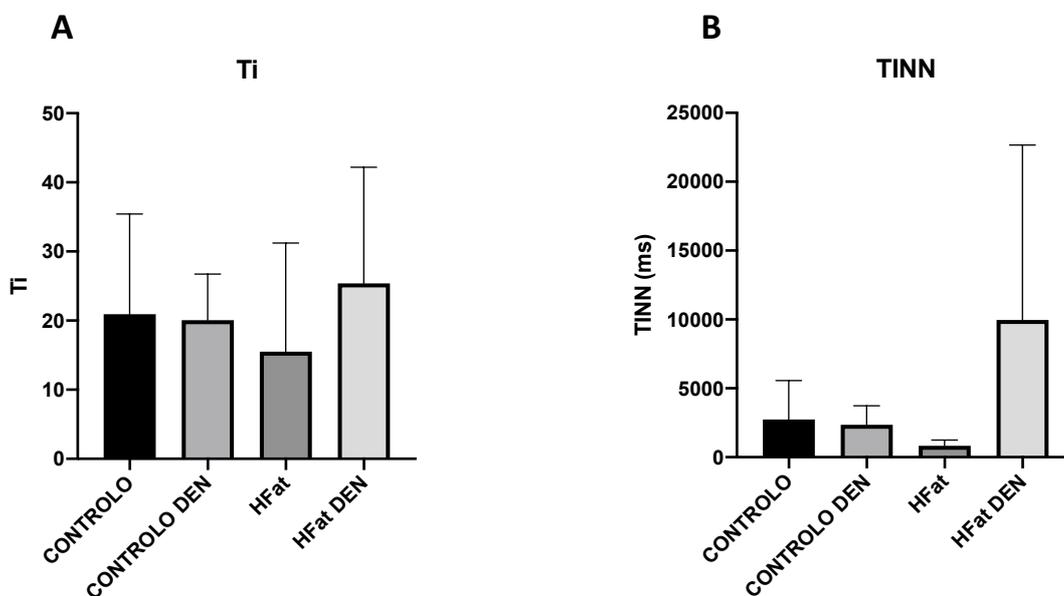
Representação dos índices utilizados para análise da VFC em grupos de animais com e sem patologia de resistência insulínica e com e sem ressecção cirúrgica do NSC: (A) média RR (em milissegundos); (B) SDNN; (C) rMSSD; (D) SDDSD; (E) pNN20 (em percentagem); (F) pNN6 (valores percentuais).

Os valores de *kurtosis* e *skewness* para os vários grupos de roedores são apresentados na Figura 64.



**Figura 64.** – Análise de parâmetros descritivos das distribuições de intervalos RR para roedores saudáveis e com patologia metabólica, com NSC intacto e resseção cirúrgica do NSC. Apresentação dos parâmetros: (A) *kurtosis*; (B) *skewness*.

Uma análise do histograma da série temporal de intervalos RR pode ser conseguida através do cálculo de parâmetros de origem geométrica. Os resultados índices caracterizadores dos respectivos histogramas são apresentados na Figura 65.



**Figura 65.** – Efeito da denervação do NSC nos índices geométricos de análise do histograma de séries temporais de intervalos RR. Representação gráfica dos índices: (A)  $T_i$ ; (B)  $TINN$ .

O grupo de animais HFat tende a apresentar valores de Ti e TINN mais reduzidos, quando comparados a animais Controlo. Quando sujeitos a denervação do NSC (grupo HFat DEN), os valores destes índices aumentam e tendem a ser superiores aos valores controlo. Os animais não patológicos, quando sujeitos a denervação do NSC (grupo Controlo DEN), tendem a reduzir os valores de Ti e TINN de forma pouco significativa.

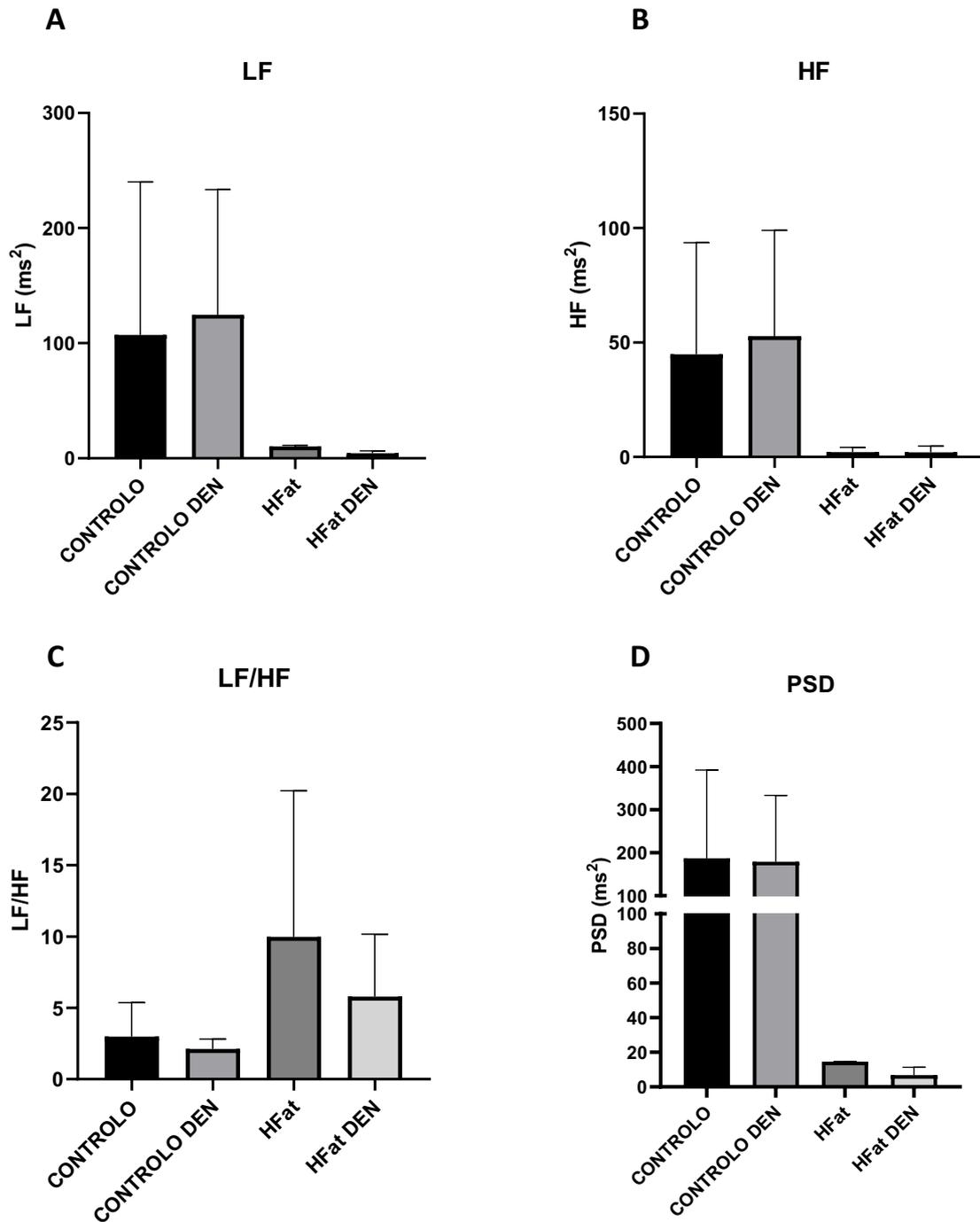
### **Análise da VFC no domínio da frequência:**

Os animais sujeitos a uma dieta hipercalórica (grupo HFat) apresentam um valor mais elevado de LF e de LF/HF e um valor mais reduzido de HF e PSD, quando comparados aos animais expostos a uma dieta dita normal. Estes resultados estão de acordo com os resultados previamente obtidos neste projeto, quando comparados os efeitos de dietas hipercalóricas no domínio da frequência da VFC e também com os dados previamente publicados pelo grupo [6]. Na Figura 66 são apresentados os resultados obtidos no domínio da frequência, para os vários grupos de animais em estudo.

Os animais do grupo Controlo DEN apresentam, também, um valor mais elevado de LF e um valor mais reduzido de HF, quando comparados aos animais do grupo Controlo.

Os valores de PSD tendem a ser sensivelmente semelhantes entre os grupos controlo estudados (Controlo e Controlo DEN).

O grupo HFat DEN apresenta um valor médio de LF/HF mais reduzido, em relação ao grupo HFat e, portanto, mais próximo do valor do grupo Controlo. O mesmo parece ser verificado em animais sem patologia sujeitos a bloqueio cirúrgico do NSC: o grupo Controlo DEN apresenta um valor médio mais reduzido do rácio LF/HF, quando comparado ao grupo Controlo. Estes resultados estão de acordo com os resultados descritos na literatura [6].



**Figura 66.** – Efeito da denervação do NSC no SNA de roedores saudáveis e com patologia metabólica.

Representação gráfica dos parâmetros utilizados para análise da VFC por exibição da média e respectiva barra de erro: (A) LF; (B) HF; (C) LF/HF; (D) PSD.

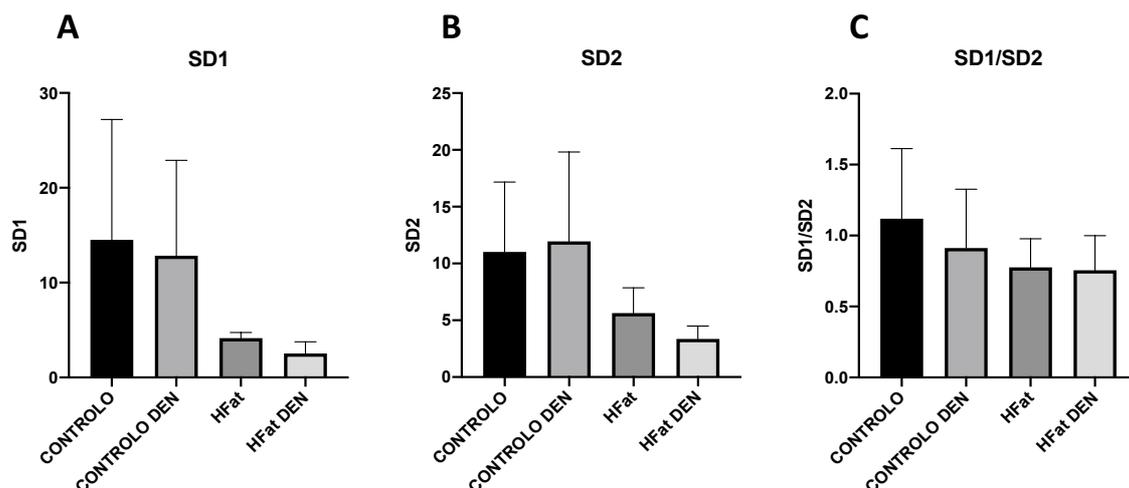
**Análise da VFC por métodos não lineares no domínio do tempo:**

Quanto à forma das dispersões de Poincaré, não se registam diferenças significativas entre os grupos. A maioria dos animais apresenta um gráfico de Poincaré com uma forma de Torpedo, em todos os grupos em estudo. Na Tabela 10 são apresentadas as várias formas obtidas para os gráficos de Poincaré dos animais dos vários grupos.

Posto isto, conclui-se que uma análise quantitativa da dispersão de Poincaré será mais rigorosa na diferenciação entre os vários grupos. Na Figura 67 são apresentados os resultados obtidos para os vários grupos de roedores, para os parâmetros de quantificação da dispersão de Poincaré SD1, SD2 e SD1/SD2.

**Tabela 10.** – Representação das formas das dispersões dos gráficos de Poincaré obtidas para os vários grupos, no estudo do bloqueio cirúrgico do nervo do seio carotídeo. Apresentação do valor numérico e percentual dos tipos de formas obtidas em cada um dos grupos.

<b>Grupo</b>	<b>Forma da dispersão de Poincaré</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Controlo</b>	Forma de Torpedo	2	32
	Padrão de Lóbulo triplo	1	17
	SZ-Leque	1	17
	Padrão de ilha do tipo A	1	17
	Padrão de ilha do tipo B	1	17
<b>HFat</b>	Forma de Torpedo	2	100
<b>Controlo DEN</b>	Forma de Torpedo	1	33,(3)
	Padrão de Lóbulo duplo	1	33,(3)
	Indefinida	1	33,(3)
<b>HFat DEN</b>	Forma de Torpedo	3	75
	Indefinida	1	25



**Figura 67.** – Efeito da denervação do NSC no SNA em animais sujeitos a uma dieta normal e a uma dieta hiperclórica.

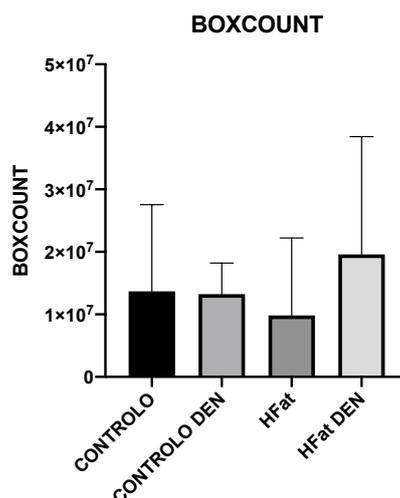
Índices de análise das dispersões de Poincaré: (A) SD1; (B) SD2; (C) rácio SD1/SD2.

Nota-se uma redução dos parâmetros de análise dos gráficos de Poincaré (SD1 e SD2) e uma conseqüente redução do rácio SD1/SD2 para animais expostos a uma dieta hiperclórica (grupo HFat).

Entre o grupo Controllo e o grupo Controllo DEN, que representam roedores saudáveis com NSC intacto e roedores saudáveis com ressecção do NSC, respetivamente, não apresentam diferenças significativas entre si. Os parâmetros SD1, SD2 e SD1/SD2 permanecem sensivelmente semelhantes entre estes grupos.

O grupo HFat DEN apresenta valores de SD1, SD2 e SD1/SD2 relativamente baixos, quando comparados ao grupo Controllo, e semelhantes ao grupo HFat.

Na Figura 68 são apresentados os valores médios do parâmetro *boxcount* para os três grupos de animais em estudo, parâmetro que avalia a área de ocupação da dispersão de Poincaré. Um maior valor de *boxcount* estará relacionado com uma maior dispersão dos pontos, logo, com uma maior variabilidade dos intervalos RR.



**Figura 68.** – Representação da variação do parâmetro *boxcount*, resultado de uma análise do gráfico de Poincaré, para animais com e sem patologia metabólica com NSC intacto e sujeitos a resseção cirúrgica do NSC.

Para animais com patologia metabólica com NSC intacto (grupo HFat), verifica-se uma tendência para uma ligeira redução do parâmetro *boxcount*, em relação a animais sem patologia com NSC intacto (grupo Controlo). Isto será indicativo de uma menor variabilidade entre os intervalos RR em animais com patologia. No entanto, esta redução não é significativa.

Animais com patologia metabólica sujeitos a resseção cirúrgica do NSC (grupo HFat DEN) apresentam um valor de *boxcount* mais elevado do que animais patológicos com NSC intacto.

O grupo Controlo DEN apresenta um valor médio do parâmetro *boxcount* ligeiramente mais baixo do que o grupo Controlo, o que poderá ser indicativo de uma ligeira redução, não significativa, da dispersão de pontos do gráfico de Poincaré.

#### **Análise por testes estatísticos dos resultados obtidos nos vários domínios:**

Uma análise estatística de todos os resultados permite verificar a significância das diferenças encontradas entre os grupos.

Na Tabela 11 são apresentados os resultados (valor de  $p$ ) para um teste unidirecional de variância (*One-Way ANOVA*) para os vários parâmetros estudados, comparando o grupo de animais exposto a uma dieta hipercalórica e os grupos de animais sujeitos a bloqueio cirúrgico do NSC com o grupo de controlo.

**Tabela 11.** – Apresentação dos resultados de uma análise de variância unidirecional (*One-Way ANOVA*) na avaliação da denervação do NSC no sistema nervoso autónomo. Todos os grupos (HFat, Controlo DEN e HFat DEN) são comparados ao grupo Controlo e é apresentado o valor de *p* para cada parâmetro analisado e cada grupo estudado.

	<b>Grupo</b>	<b>Valor de <i>p</i></b>	<b>Estatisticamente significativo?</b>
<b>MÉDIA FC</b>	HFat	0,6216	Não
	Controlo DEN	0,6150	Não
	HFat DEN	0,9883	Não
<b>MÉDIA RR</b>	HFat	0,7203	Não
	Controlo DEN	0,8151	Não
	HFat DEN	0,9994	Não
<b>SDNN</b>	HFat	0,9222	Não
	Controlo DEN	0,9980	Não
	HFat DEN	0,9941	Não
<b>rMSSD</b>	HFat	0,9220	Não
	Controlo DEN	0,9980	Não
	HFat DEN	0,9941	Não
<b>SDSD</b>	HFat	0,6656	Não
	Controlo DEN	0,9777	Não
	HFat DEN	0,9380	Não
<b>pNN20</b>	HFat	0,5026	Não
	Controlo DEN	0,9459	Não
	HFat DEN	0,3885	Não
<b>pNN6</b>	HFat	0,6068	Não
	Controlo DEN	0,9979	Não
	HFat DEN	0,1149	Não
<b>Kurtosis</b>	HFat	0,9957	Não
	Controlo DEN	0,6707	Não
	HFat DEN	0,2156	Não
<b>Skewness</b>	HFat	0,8930	Não
	Controlo DEN	0,5005	Não
	HFat DEN	0,0734	Não
<b>Ti</b>	HFat	0,9459	Não

CAPÍTULO 5. ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

	Controlo DEN	0,9996	Não
	HFat DEN	0,9399	Não
	HFat	0,9777	Não
<b>TINN</b>	Controlo DEN	0,9997	Não
	HFat DEN	0,3162	Não
	HFat	0,8590	Não
<b>LF</b>	Controlo DEN	0,1079	Não
	HFat DEN	0,6572	Não
	HFat	0,5317	Não
<b>HF</b>	Controlo DEN	0,8784	Não
	HFat DEN	0,3520	Não
	HFat	0,8724	Não
<b>PSD</b>	Controlo DEN	0,9241	Não
	HFat DEN	0,9972	Não
	HFat	0,1755	Não
<b>LF/HF</b>	Controlo DEN	0,9821	Não
	HFat DEN	0,6677	Não
	HFat	0,4685	Não
<b>SD1</b>	Controlo DEN	0,9909	Não
	HFat DEN	0,1966	Não
	HFat	0,5319	Não
<b>SD2</b>	Controlo DEN	0,9915	Não
	HFat DEN	0,1309	Não
	HFat	0,6413	Não
<b>SD1/SD2</b>	Controlo DEN	0,8321	Não
	HFat DEN	0,4249	Não
	HFat	0,9787	Não
<b>Boxcount</b>	Controlo DEN	>0,9999	Não
	HFat DEN	0,8752	Não

Conclui-se, então, que nenhum dos parâmetros analisados mostra ser estatisticamente relevante na diferenciação dos grupos. Esta reduzida significância

estatística de distinção entre os grupos pode ser explicada pela dimensão reduzida dos grupos.

De qualquer modo, é possível verificar que o parâmetro LF/HF apresenta um valor de  $p$  mais baixo para o grupo HFat. Isto poderá ser indício de que este parâmetro será mais distinto entre animais com e sem patologia, mais concretamente, entre o grupo Controlo e o grupo HFat. Verifica-se que o grupo Controlo DEN apresenta um valor de  $p$  bastante elevado para este parâmetro, refletindo a proximidade deste grupo ao grupo Controlo. O grupo HFat DEN apresenta um valor de  $p$ , para o parâmetro LF/HF, razoavelmente mais elevado do que o grupo HFat, demonstrando-se, assim, que, no que a este parâmetro concerne, o bloqueio do NSC aproxima os animais patológicos aos animais saudáveis.

## 5.4. Estudo detalhado da VFC no domínio da frequência

Quando considerada uma análise no domínio da frequência, as diferenças entre os grupos são ainda mais nítidas. Alguns autores defendem que uma análise no domínio da frequência será preferível para medidas de curto prazo, na ordem dos 5 minutos de aquisição [30]. Todas as aquisições consideradas, numa situação de ausência de estímulo, apresentam uma dimensão inferior a 16 minutos, situando-se a grande maioria em 8 minutos.

Perante esta importância de uma análise da VFC no domínio da frequência na caracterização e distinção entre os vários grupos de animais em estudo, pensou-se ser relevante uma análise mais detalhada neste domínio. Assim, foram considerados os grupos: Controlo, HFat, HFHSu, Controlo DEN e HFat DEN. O objetivo foi procurar analisar o impacto de diferentes dietas e do bloqueio cirúrgico do NSC no SNA, através da análise da VFC no domínio da frequência.

Neste capítulo serão apresentadas outras abordagens de tratamento de dados no domínio da frequência, as quais deverão ser tidas em conta, por forma a garantir uma análise abrangente e pormenorizada das séries temporais de intervalos RR no domínio da frequência.

Alguns autores defendem a utilização de um valor de densidade de potência para as LF e para as HF normalizado (LF norm e HF norm, respetivamente), isto é, ao invés de se considerar apenas o valor calculado para a densidade de potência em cada intervalo de frequências pré-estabelecido (neste caso, LF e HF), considerar o valor normalizado, o que pode ser conseguido tal como explicado na equação 5.1 [77].

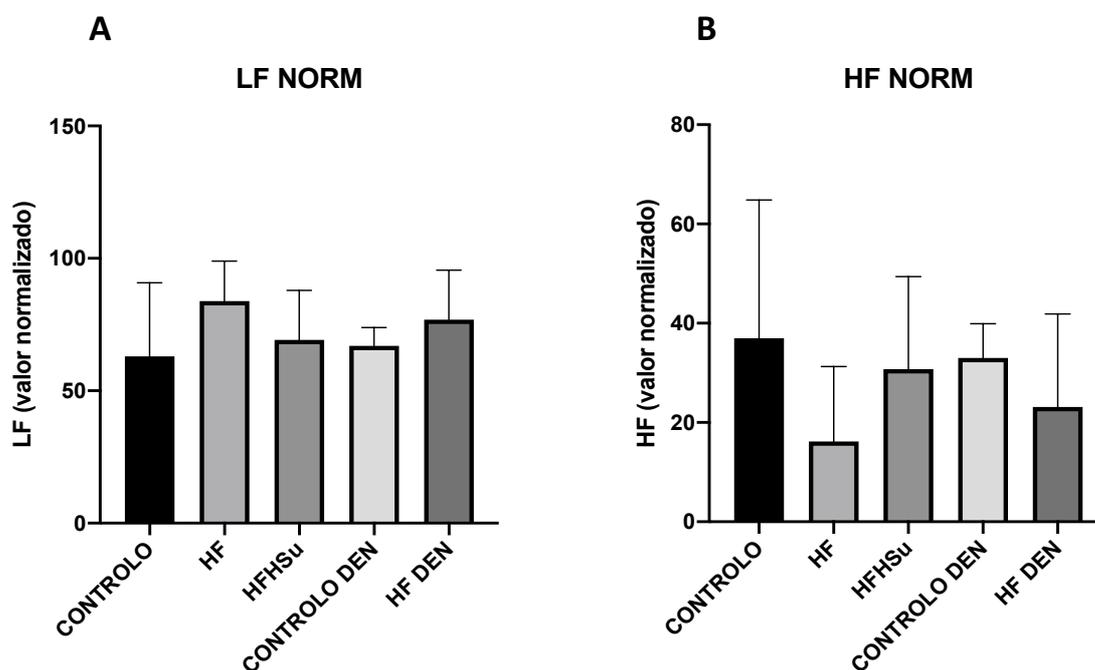
$$LF \text{ norm} = 100 \times \frac{LF}{(LF + HF)} \quad (5.1)$$

O mesmo pode ser aplicado para o caso das HF, sendo exemplificado na equação 5.2.

$$HF \text{ norm} = 100 \times \frac{HF}{(LF + HF)} \quad (5.2)$$

Os valores normalizados da densidade de potência das baixas e altas frequências, representados pelos índices LF e HF, respetivamente, para todos os grupos de animais em estudo, são ilustrados graficamente na Figura 69.

Quando se considera, diretamente, o valor de LF e HF para cada espectro de potência como parâmetro comparativo entre animais, assume-se a semelhança entre os vários espectros. No entanto, existe alguma variação entre o perfil dos vários espectros de potência e, portanto, torna-se relevante considerar uma medida de comparação normalizada.



**Figura 69.** – Efeito de dietas hipercalóricas e da denervação do NSC no SNA de roedores saudáveis e de roedores com patologia metabólica.

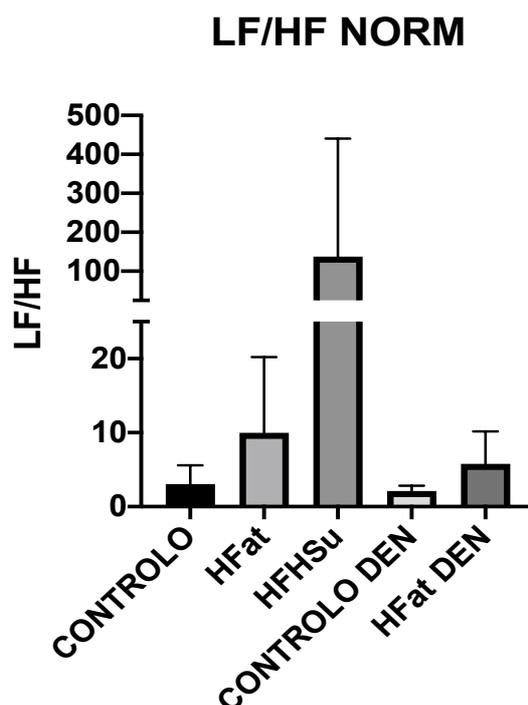
Representação gráfica dos parâmetros normalizados utilizados para análise da VFC no domínio da frequência, por exibição da média e respetiva barra de erro: (A) LF normalizado; (B) HF normalizado.

Partindo dos valores normalizados dos índices LF e HF, conclui-se que o grupo HFat apresenta um valor relativamente elevado de LF. Os valores normalizados de LF são semelhantes entre os vários grupos.

Quanto ao índice HF, nota-se uma redução do valor de HF normalizado para o grupo HFat, comparativamente aos restantes grupos. Todos os grupos apresentam um valor normalizado de HF mais baixo do que o do grupo Controlo.

Uma redução do valor de HF está tipicamente relacionada com uma redução da atividade do SNP. Um aumento do valor de LF está relacionado com o aumento da atividade do SNS.

Se, partindo destes parâmetros com valores normalizados, se calcular os respetivos valores médios dos rácios LF/HF para os vários grupos de animais, pode-se verificar um aumento notório deste rácio para o grupo em estado mais avançado de patologia metabólica (grupo HFHSu), em relação aos restantes grupos. Estes resultados são apresentados na Figura 70.



**Figura 70.** – Representação gráfica do valor médio do rácio LF/HF normalizado e respetiva barra de erro para os vários grupos de animais estudados ao longo deste projeto.

Os animais com patologia metabólica em estado mais inicial (grupo HFat) apresentam um valor de LF/HF normalizado (LF/HF norm) mais elevado do que os animais saudáveis (grupo Controlo). O grupo de animais com patologia metabólica em estado inicial e sujeito a bloqueio cirúrgico do NSC (HFat DEN) apresenta um valor de LF/HF norm mais reduzido, em relação a animais com o

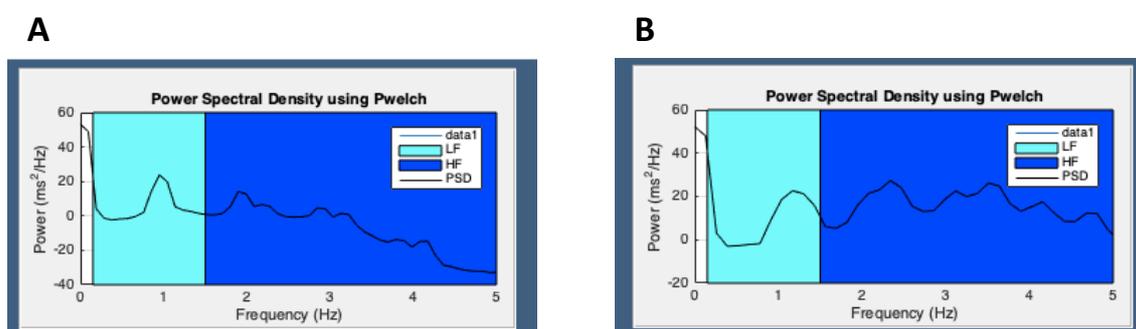
mesmo estado de patologia sem submissão a esta denervação (grupo HFat). O grupo Controlo DEN apresenta um valor de LF/HF norm semelhante ao apresentado pelo grupo Controlo.

Uma análise estatística dos resultados obtidos para os valores normalizados de LF e HF com recurso ao teste unidirecional de variância (*One-Way ANOVA*) não apresenta significância estatística relevante entre os grupos. Ressalva-se, uma vez mais, que a reduzida dimensão dos grupos pode implicar uma baixa significância estatística.

Ao longo do desenvolvimento deste projeto, surgiu a questão de se os limites estabelecidos e comumente aceites na literatura na diferenciação entre as LF e as HF são adequados de uma forma coerente a todos os animais, isto é, se se justificará a realização de alguns ajustes nestes limites, por forma a garantir que todos os animais apresentam um pico pronunciado no seu espectro de potências no intervalo definido como LF e o mesmo nas HF.

As observações conseguidas através da interface desenvolvida para análise da VFC, nomeadamente, do módulo destinado a análise no domínio da frequência, sugerem a existência de alguma heterogeneidade entre os espectros de potência dos vários animais. Todavia, apesar destas pequenas oscilações entre os vários animais, as bandas de frequências definidas parecem originar espectros de potência semelhantes entre os vários roedores, com um comportamento semelhante dentro de cada banda de frequências.

Na Figura 71 são apresentados dois exemplos de espectros de potência de ratos Wistar saudáveis. Num dos espectros nota-se que o pico mais pronunciado das LF se encontra inteiramente contido no intervalo definido como LF; no outro espectro, verifica-se que o pico mais pronunciado das LF se expande ligeiramente para o intervalo já considerado como HF.



**Figura 71.** – Apresentação de dois espectros de potência de dois animais controlo, sem patologia metabólica.

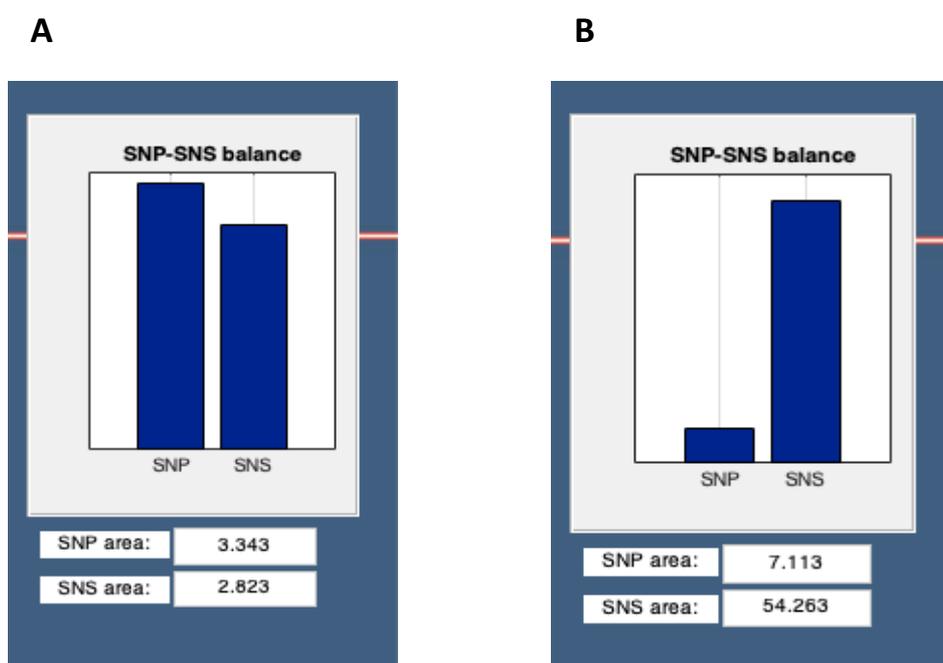
Salienta-se que: em (A) nota-se que o pico das LF se encontra totalmente dentro dos limites das LF e em (B) verifica-se que o pico das LF se tende a procurar ligeiramente para o intervalo das HF.

Os espectros de potência de cada animal em estudo foram estudados individualmente, no sentido de perceber a interferência da variação dos valores limite das LF e HF.

Posto isto, apesar de ser inequivocamente algo a explorar mais detalhadamente no futuro, esclarece-se que, para o caso em estudo, os limites diferenciadores das LF e HF são adaptados a cada espectro estudado, na certeza de que existe grande variabilidade entre indivíduos, no que aos seus espectros de potência da série temporal dos intervalos RR diz respeito.

No módulo de análise da série temporal no domínio da frequência, é disponibilizada, ao utilizador, a hipótese de cálculo, através da função *pwelch*, do espectro de potência das diferenças positivas e negativas entre intervalos RR da série de intervalos RR, em separado. São apresentados os dois espectros de potência, os quais serão uma representação da atividade da via simpática e parassimpática do SNA.

Um estudo da VFC com recurso a esta análise apresenta resultados corroborativos dos resultados previamente obtidos e descritos. Na Figura 72 são apresentados dois resultados desta análise, um correspondente a um animal saudável e um para um animal com patologia metabólica.



**Figura 72.** – Análise da VFC através do cálculo da potência das variações negativas e positivas das diferenças entre os intervalos RR, com a respetiva correspondência com o SNS e SNP. Em (A) para um rato Wistar saudável e em (B) para um rato Wistar com patologia metabólica em estado avançado.

Verifica-se, mais uma vez, que o SNS se encontra estimulado na patologia metabólica.

De realçar a insignificância deste método, por se tratar de uma forma muito simplista de averiguar sobre a atividade das vias simpática e parassimpática do SNA, assumindo que variações mais ou menos instantâneas no ritmo cardíaco são consequência, única e exclusivamente, da atividade do SNS e SNP. Esta suposição descarta, por exemplo, o papel relevante da frequência e ritmo respiratório sobre a atividade cardíaca.

Várias outras análises poderiam ser consideradas neste contexto.



## CONCLUSÕES

Em primeiro lugar, é importante realçar que o número reduzido de amostras consideradas em cada grupo de animais estudado, por limitações de dados disponíveis, torna as conclusões deste projeto menos significativas.

Tal como previamente descrito na literatura, os resultados deste estudo permitem verificar que a patologia metabólica está associada a um aumento da atividade do SNS, sem aumento da atividade opositora do SNP.

Observou-se que o aumento da atividade simpática é mais notório num estado mais avançado de patologia, o que, neste caso, é conseguido por exposição a uma dieta hipercalórica com consumo aumentado de açúcar.

Verificou-se que diferentes dietas hipercalóricas têm diferentes impactos ao nível autonómico, mas que qualquer das duas dietas hipercalóricas estudadas acarreta alterações no SNA.

A resposta fisiológica a um estímulo de anoxia parece manter-se preservada mesmo na presença de patologia metabólica. Por outro lado, a resposta a um estímulo de aumento dos níveis de glicose no sangue parece ser alterada na presença de patologia metabólica, patologia causadora da tal neuropatia autonómica já referida.

O bloqueio cirúrgico do NSC foi já descrito como capaz de retroceder as alterações metabólicas causadas por distúrbios como a Diabetes tipo 2 a nível de deposição de gordura, níveis de glicémia, tolerância à glicose e resistência à insulina, bem como, da hiper ativação do SNS. Este estudo permitiu validar estas observações e possibilitar uma análise mais individualizada e pormenorizada desta cirurgia no SNA, por meio da análise da VFC.

## 6.1. Efeitos de diferentes dietas hipercalóricas no SNA

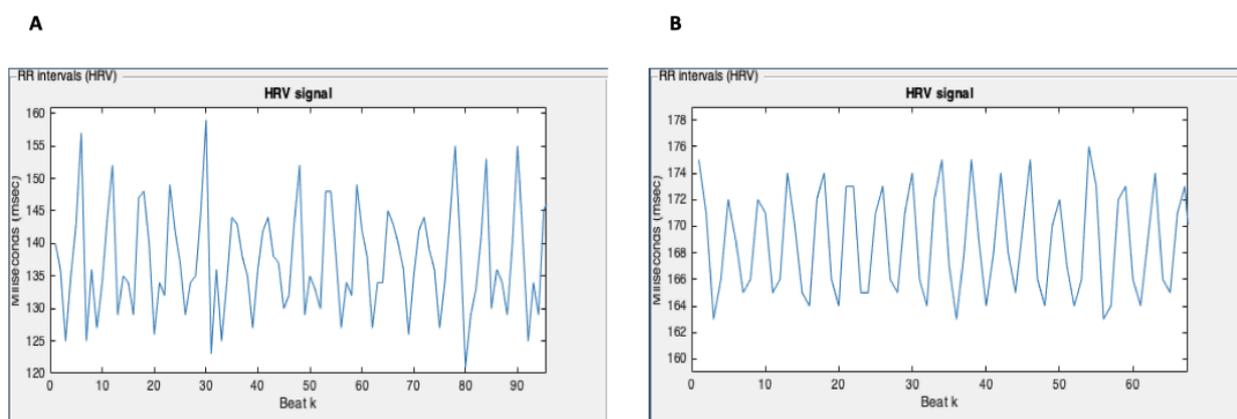
De uma simples visualização gráfica comparativa do tacograma de um rato Wistar sujeito a uma dieta *standard*, portanto, um animal metabolicamente saudável e de um rato Wistar sujeito a uma dieta hipercalórica, portanto, um animal com algum tipo de patologia metabólica, torna-se possível verificar que existe uma maior variabilidade no gráfico do animal saudável.

Uma condição de distúrbio metabólico induzido por uma dieta hipercalórica afeta, de forma visível, a VFC e, portanto, a atividade do SNA.

Na Figura 73 podem ser visualizados dois tacogramas de intervalos RR, um para um rato Wistar saudável, exposto a uma dieta *standard*; e um para um rato Wistar com Síndrome Metabólico e Diabetes tipo 2, por exposição a uma dieta hipercalórica com aumento do consumo de açúcares.

Sendo sabido que a VFC está diretamente relacionada com o SNA, pode-se concluir que existem diferenças a nível autonómico entre um indivíduo com e sem patologia metabólica.

Animais sujeitos a uma dieta hipercalórica tendem a apresentar um valor ligeiramente mais elevado de FC e uma menor VFC do que animais expostos a uma dieta *standard*. Dietas hipercalóricas conduzem ao desenvolvimento de patologia metabólica e conseqüente neuropatia do SNA, por um aumento da atividade do SNS sem compensação da atividade opostora do SNP.



**Figura 73.** – Tacograma de intervalos RR em função de cada batimento cardíaco para uma condição saudável e uma condição de patologia metabólica.

Em (A) o tacograma para um rato Wistar saudável e em (B) para um rato Wistar com patologia metabólica.

Uma análise dos parâmetros utilizados para caracterização da VFC no domínio do tempo (média RR, SDNN, rMSSD, SDSD, pNN20, pNN6) permite verificar uma redução da VFC perante uma condição patológica induzida por dietas hipercalóricas. Os animais expostos a uma dieta hipercalórica apresentam menores valores de SDNN, rMSSD, SDSD, pNN20 e pNN6, em relação aos animais do grupo Controlo, e, portanto, uma menor VFC.

No domínio da frequência, o rácio LF/HF entende-se como preditor da atividade simpática em relação à atividade parassimpática. Assim, animais intolerantes à glicose e/ou resistentes à insulina tenderão a apresentar uma atividade aumentada do SNS, por oposição à atividade do SNP, sendo mais explícito no grupo sujeito a uma dieta hipercalórica com consumo aumentado de açúcares.

Pode-se entender que os distúrbios metabólicos acarretam alterações no SNA, por inibição da atividade do SNP, mais evidentes num curto prazo, ou seja, numa redução da variabilidade entre intervalos RR de batimentos cardíacos consecutivos.

Conclui-se então que, em primeiro lugar, qualquer das dietas hipercalóricas estudadas acarreta alterações ao nível do SNA. Portanto, uma condição de patologia metabólica, independentemente de se tratar de um estado mais inicial ou mais avançado, implica alterações na regulação simpática e parassimpática, com consequências na VFC.

Em segundo lugar, verifica-se que a hiperestimulação do SNS, descrita numa condição de distúrbio metabólico, aumenta com o avanço da patologia. Os animais do grupo HFHSu, modelos de Diabetes tipo 2 em humanos e com um estado mais avançado de patologia, quando comparados ao grupo HF, apresentam uma atividade simpática mais elevada, sem compensação por parte da atividade parassimpática, que parece permanecer constante ou, até mesmo, reduzida.

## **6.2. Efeitos de diferentes dietas hipercalóricas na resposta autonómica**

O segundo objetivo do presente projeto era o de verificar a resposta autonómica na presença de patologia metabólica, por alterações da VFC, numa condição de estímulo metabólico e não metabólico.

Para um estímulo não metabólico, no presente estudo definido como uma condição de anoxia, verifica-se que o perfil de variação da média RR e, consequentemente, variação da FC, é semelhante em animais saudáveis e em animais diabéticos.

O perfil de variação da FC e da VFC parece manter-se semelhante entre animais saudáveis e animais com patologia metabólica, aquando da exposição a um estímulo não metabólico, neste caso, a privação temporária de oxigénio. Apesar da FC ser mais elevada e a VFC ser mais reduzida em animais com distúrbio metabólico, a variação, quer da FC, quer da VFC, mostra-se, ao longo do estímulo, semelhante entre animais saudáveis e patológicos. Conclui-se, então, que a resposta autonómica a um estímulo não metabólico não se encontra prejudicada numa condição de patologia metabólica.

Por outro lado, perante um estímulo metabólico, os animais portadores de patologia metabólica parecem responder de uma forma mais lenta e menos eficiente, por variações mais tardias e reduzidas na FC e na VFC, quando comparados a animais saudáveis.

Esta discrepância entre a atividade das vias simpática e parassimpática do SNA tende a prejudicar a resposta a um estímulo metabólico, neste caso, o aumento dos níveis de glicose no sangue.

Para um estímulo metabólico, no presente estudo representado pelo aumento dos níveis de glicose no sangue, através de injeção intravenosa, verifica-se, mais uma vez, que o perfil de variação da VFC é semelhante em animais saudáveis e em animais diabéticos. No entanto, os animais saudáveis respondem ao estímulo metabólico de uma forma mais imediata e eficiente.

Os animais com patologia metabólica, diabéticos, são intolerantes à glicose e resistentes à insulina e demoram mais tempo a desencadear qualquer resposta autonómica, perante uma elevação da concentração sanguínea de glicose.

Num estímulo de glicose, indivíduos saudáveis respondem através do aumento da FC, sem modificação significativa da VFC. Por outro lado, em indivíduos com patologia metabólica o mais notório, na resposta a este estímulo, prende-se com o aumento da atividade simpática e decréscimo do tónus parassimpático (por variação do valor de LF/HF), o que sugere um desequilíbrio no SNA como consequência de uma situação de uma condição de hiperglicemia.

### **6.3. Efeitos da denervação do NSC na resistência insulínica**

A VFC parece estar prejudicada em animais com patologia metabólica e NSC intacto. Quando sujeitos a denervação do NSC, estes animais, portadores de patologia metabólica, tendem a aumentar a VFC e a aproximar-se da VFC de animais saudáveis tidos como controlo.

Animais saudáveis sujeitos a denervação do NSC apresentam uma redução do valor da atividade simpática, ainda que menos significativa do que aquando da denervação em animais patológicos, em relação à atividade parassimpática (por variação do valor do índice LF/HF) e uma VFC semelhante a animais saudáveis com NSC intacto.

Nota-se uma hiper ativação da atividade do SNS em animais com patologia metabólica e NSC intacto, por oposição a animais saudáveis. O bloqueio cirúrgico do NSC, nestes animais patológicos, reduz a atividade do SNS, reestabelecendo um equilíbrio entre ambas as vias do SNA e aproximando a regulação autonómica a uma condição de não patologia.

O bloqueio cirúrgico do NSC implica uma redução da atividade simpática em animais com patologia metabólica e em animais saudáveis.

Ao denervar o NSC, perde-se a influência do SNS sobre este, sem perda da influência do SNP. Apesar de ambas as vias atuarem, ao nível do coração, por outras formas para além do CC, uma via de comunicação com o SNS acaba por ser perdida. Isto pode resultar numa ligeira redução da VFC em animais sujeitos a bloqueios do NSC, por redução não significativa dos valores dos índices SDNN, rMSSD e SDSD. Por outro lado, ao privar esta via de atuação do SNS, os animais, tanto saudáveis como patológicos, apresentam um valor mais reduzido do parâmetro LF/HF, sendo esta redução mais visível em animais com patologia metabólica.

Os resultados obtidos neste projeto, e nos vários estudos previamente publicados neste âmbito, clarificam o papel do CC na patogénese das doenças metabólicas e sugerem que a modulação da atividade do NSC pode ser um alvo terapêutico promissor para as patologias metabólicas.

## 6.4. Trabalhos futuros

Apesar dos resultados interessantes a que se chegou, sugere-se a validação das conclusões para amostras maiores, uma vez que a dimensão dos grupos estudados era reduzida. No entanto, para este estudo, considera-se ter conseguido uma amostra de modelos animais representativa da patologia metabólica em humanos.

Torna-se importante, também, homogeneizar o procedimento de recolha de dados e garantir que todas as séries de intervalo RR são adquiridas nas mesmas condições, nomeadamente, a nível de especificações do *software* de recolha de dados.

Apesar dos resultados positivos que apresenta, por retroceder os efeitos da

patologia metabólico a nível autonómico, a denervação cirúrgica do NSC não será, certamente, aceite como terapêutica nas doenças do foro metabólico. Este procedimento, para além de invasivo, pode implicar outros efeitos ainda não identificados. Estes efeitos poderão ser adversos e implicar complicações mais ou menos graves. Assim, o grupo da professora Sílvia Conde, tem-se dedicado à investigação na procura de estratégias terapêuticas que permitam a modulação da atividade deste órgão e que acarrete efeitos colaterais mínimos.

Neste sentido, o grupo tem testado a utilização de corrente alternada de alta frequência, com o intuito de bloquear a transmissão de informação elétrica no NSC. Neste seguimento, foi demonstrado, pela primeira vez, que o bloqueio elétrico bilateral da atividade do nervo sensitivo do CC replica os efeitos metabólicos benéficos da denervação bilateral do NSC.

O procedimento apresentado neste estudo deve ser aplicado a estudos de bloqueio elétrico bilateral por altas frequências, procurando perceber se os benefícios a nível do SNA são semelhantes.

## Referências Bibliográficas

- [1] World Health Organization, "Obesity and Overweight Fact Sheets", 2018. [Online]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acedido em: Agosto, 15, 2019.
- [2] International Diabetes Federation (2017). *IDF Diabetes Atlas*, 8th edn. IDF, Brussels. [Online]. Disponível em: <http://www.diabetesatlas.org/>. Acedido em: Agosto, 15, 2019.
- [3] M. J. Ribeiro, J. F. Sacramento, C. Gonzalez, M. P. Guarino, E. C. Monteiro, S. V. Conde, "Carotid Body Denervation Prevents the Development of Insulin Resistance and Hypertension Induced by Hypercaloric Diets", *Diabetes*, vol. 62, pp. 2905-2916, 2013.
- [4] B. F. Melo, J. F. Sacramento, M. J. Ribeiro, C. S. Prego, M. C. Correia, J. C. Coelho, J. P. Cunha-Guimarães, T. Rodrigues, T. Rodrigues, I. B. Martins, M. P. Guarino, R. M. Seça, P. Matafome, S. V. Conde, "Evaluating the Impact of Different Hypercaloric Diets on Weight Gain, Insulin Resistance, Glucose Intolerance, and its Comorbidities in Rats", *Nutrients*, vol. 11, 2019.
- [5] S. V. Conde, M. J. Ribeiro, B. F. Melo, M. P. Guarino e J. F. Sacramento, "Insulin resistance: a new consequence of altered carotid body chemoreflex?", *J. Physiol.*, vol. 595, pp. 31-32, 2016.
- [6] J. F. Sacramento, D. J. Chew, B. F. Melo, M. Donegá, W. Dopson, M. P. Guarino, A. Robinson, J. Pietro-Lloret, S. Patel, B. J. Holinski, N. Ramnarain, V. Píkov, K. Famm, S. V. Conde, "Bioelectronic modulation of carotid sinus nerve activity in the rat: a potential therapeutic approach for type 2 diabetes", *Diabetologia*, vol. 61, pp. 700-710, 2018.
- [7] G. Perpiñan, E. Severeyn, S. Wong, M. Altuve, "Cardiac autonomic modulation in response to a glucose stimulus", *Medical & Biological Engineering & Computing*, vol. 57, pp. 667-676, 2019.
- [8] A. M. Sharma, V. T. Chetty, "Obesity, hypertension and insulin resistance", *Acta Diabetol*, vol. 42, pp. S3-S8, 2005.
- [9] American Heart Association (AHA), "Answers by heart – Cardiovascular Conditions", 2015. [Online]. Disponível em: <https://www.heart.org/-/media/files/health-topics/answers-by-heart/what-is-metabolic-syndrome-300322.pdf?la=en&hash=3B60478685B71C2CD6CEB93782DAE8B7EAD33445>. Acedido em: Agosto, 15, 2019.

- [10] N. R. Prabhakar, M. J. Joyner, "Tasting arterial blood: what do the carotid chemoreceptors sense?", *Front Physiol*, vol. 5, p. 524, 2015.
- [11] S. V. Conde, J. F. Sacramento e M. P. Guarino, "Carotid body: a metabolic sensor implicated in insulin resistance", *Physiol Genomics*, vol. 50, pp. 208-214, 2018.
- [12] S. V. Conde, J. F. Sacramento, M. P. Guarino, C. Gonzalez, A. Obeso, L. N. Diogo, E. C. Monteiro e M. J. Ribeiro, "Carotid body, insulin, and metabolic diseases: unraveling the links", *Frontiers in Physiology*, vol. 5, 2014
- [13] J. Pumplra, K. Howorka, D. Groves, M. Chester e J. Nolan, "Functional assessment of heart rate variability: Physiological basis and practical applications", *International Journal of Cardiology*, vol. 84, n.º 1, pp. 1-14, 2002.
- [14] International Diabetes Federation (2018). *Taking Diabetes to Heart*, 1st edn. IDF, Brussels.
- [15] Katia de Angelis, Maria Claudia Irigoyen, Mariana Morris, "Diabetes and Cardiovascular Autonomic Dysfunction: Application of Animal Models", *Auton Neurosci*, vol. 145 (1-2), pp. 3-10, 2009.
- [16] J. Thireau, B. L. Zhang, D. Poisson e D. Babuty, "Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide", *Exp Physiol*, vol. 93, n.º 1, pp. 83-94, 2007.
- [17] A. C. Guyton e J. E. Hall, *Textbook of medical physiology*, Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders, 2006.
- [18] C. A. G. Martinez, A. O. Quintana, X. A. Vila, M. J. L. Tourino, L. Rodríguez-Linares, J. M. R. Presedo e A. J. M. Penín, *Heart Rate Variability Analysis with the R package RHRV*, Switzerland: Springer, 2017.
- [19] L. C. M. Vanderlei, C. M. Pastre, R. A. Hoshi, T. D. d. Carvalho, "Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica", *Rev Bras Cir Cardiovasc*, vol. 24, n.º 2, pp. 205-217, 2009.
- [20] Aaron I. Vinik, "The conductor of the autonomic orchestra", *Frontiers in Endocrinology*, vol. 3, 2012.
- [21] J. Cacioppo, L. G. Tassinary e G. G. Berntson, *The handbook of psychophysiology*, Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2007.
- [22] R. Plonsey e R. C. Barr, *Bioelectricity a quantitative approach*, North Carolina, USA: Springer, 2007.
- [23] H. ChuDuc, K. NguyenPhan e D. NguyenViet, "A review of heart rate variability and its applications", *APCBEE Procedia*, vol. 7, pp. 80-85, 2013
- [24] M. P. Tarvainen, J. Niskanen, J. A. Lipponen, P. O. Ranta-aho e P. A. Karjalainen, "Kubios HRV – heart rate variability analysis software", *Computer*

*Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 113, pp. 210-220, 2014.

[25] P. M. Lehrer, R. Gevirtz, "Heart rate variability biofeedback: how and why does it work?", *Frontiers in Physiology*, vol. 5, 2014.

[26] C. A. Swenne, "Baroreflex sensitivity: mechanisms and measurement", *Neth Heart J*, vol. 21, pp. 58-60, 2013.

[27] J. Niskanen, M. P. Tarvainen, P. O. Ranta-aho, P. A. Karjalainen, "Software for advanced HRV analysis", *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 76, pp. 73-81, 2004.

[28] P. K. Stein, M. S. Bosner, R. E. Kleiger e B. M. Conger, "Heart rate variability: a measure of cardiac autonomic tone", *American Heart Journal*, vol. 127, n.º 5, pp. 1376-1381, 1994.

[29] H. V. Huikuri, T. H. Makikallio e J. Perkiomaki, "Measurement of heart rate variability by methods based on nonlinear dynamics", *Jornal of Electrocardiology*, vol. 36, pp. 95-99, 2003.

[30] Hye-Geum Kim, Eun-Jin Cheon, Dai-Seg Bai, Young Hwan Lee, Bom-Hoon Koo, "Stress and Heart Rate Variability: A Meta-Analysis and Review of the Literature", *Psychiatry Investig*, vol. 15(3), pp. 235-245, 2018.

[31] Emily B. Schroeder, Lloyd E. Chambless, Duanping Liao, Ronald J. Prineas, Gregory W. Evans, Wayne D. Rosamond, Gerardo Heiss, "Diabetes, Glucose, Insulin, and Heart Rate Variability", *Diabetes Care*, vol. 28 (3), pp. 668-674, 2005.

[32] G. Ernst, "Heart-rate variability – more than heart beats?", *Frontiers in Public Health*, vol. 5, 2017.

[33] P. K. Stein, M. S. Bosner, R. E. Kleiger e B. M. Conger, "Heart rate variability: a measure of cardiac autonomic tone", *American Heart Journal*, vol. 127, n.º 5, pp. 1376-1381, 1994.

[34] J. Niskanen, M. P. Tarvainen, P. O. Ranta-aho, P. A. Karjalainen, "Software for advanced HRV analysis", *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 76, pp. 73-81, 2004.

[35] J. Sztajzel, "Heart rate variability: a noninvasive electrocardiographic method to measure the autonomic nervous system", *Swiss Med Wkly*, vol. 134, pp. 514-522, 2004.

[36] R. M. d. F. Pinto, "Novas abordagens ao estudo de sinais biomédicos: análise em tempo-frequência e transformada de Hilbert-Huang", Ph. D Dissertação, DF, FCUL, Lisboa, PT, 2009.

[37] R. E. Kleiger, P. K. Stein e J. T. Bigger, "Heart rate variability: measurement and clinical utility", *A.N.E.*, vol. 10, n.º 1, pp. 88-101, 2005.

[38] F. Shaffer, J. P. Ginsberg, "An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms", *Frontiers in Public Health*, vol. 5, 2017.

- [39] Agnieszka Kitlas Golinska, "Poincaré Plots in Analysis of Selected Biomedical Signals", *Studies in Logic, Grammar and Rhetoric*, vol. 35 (48), 2013.
- [40] M. Brennan, M. Palaniswami, P. Kamen, "Do existing measures of Poincaré plot geometry reflect nonlinear features of Heart Rate Variability?", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 48 (11), 2001.
- [41] Hans D. Esperer, Chris Esperer, Richard J. Cohen, "Cardiac Arrhythmias Imprint Specific Signatures on Lorenz Plots", *A.N.E.*, vol. 13 (1), pp. 44-60, 2008.
- [42] J. M. Yentes, N. Hunt, K. K. Schmid, J. P. Kaipust, D. McGrath, N. Stergiou, "The Appropriate Use of Approximate Entropy and Sample Entropy with Short Data Sets", *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 41 (2), pp. 349-365, 2013.
- [43] X. Chen, I. C. Solomon, K. H. Chon, "Comparison of the Use of Approximate Entropy and Sample Entropy: Applications to Neural Respiratory Signal", in *Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference*, (Shanghai, China), 2005, pp. 4212-4215.
- [44] M. Costa, A. L. Goldberger, C. K. Peng, "Multiscale entropy analysis of biological signals", *Physical Review*, vol. 71, 2005.
- [45] C. Gonzalez, L. Almaraz, A. Obeso e R. Rigual, "Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges", *Physiological Reviews*, vol. 74, n.º 4, pp. 829-898, 1994.
- [46] A. Y. Taha, "Carotid body tumours: a review", *International Journal of Clinical Medicine*, vol. 6, pp. 119-131, 2015.
- [47] R. De Caro, V. Macchi, M. M. Sfriso, A. Porzionaro, "Structural and neurochemical changes in the maturation of the carotid body", *Respiratory Physiology & Neurobiology*, vol. 185, pp. 9-19, 2013.
- [48] S. W. Porges, "Cardiac vagal tone: a physiological index of stress", *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 19, n.º 2, pp. 225-233, 1995.
- [49] C. M. Masi, L. C. Hawkey, E. M. Rickett, J. T. Cacioppo, "Respiratory sinus arrhythmia and diseases of aging: Obesity, diabetes mellitus, and hypertension", *Biological Psychology*, vol. 74, pp. 212-223, 2007.
- [50] M. W. Roy, K. C. Lee, R. E. Miller, "Neural Control of Pancreatic Insulin and Somatostatin Secretion", *Endocrinology*, vol. 115 (2), pp. 770-775, 1984.
- [51] P. J. Boyle, S. B. Liggett, S. D. Shah, P. E. Cryer, "Direct Muscarinic Cholinergic Inhibition of Hepatic Glucose Production in Humans", *J. Clin. Invest.*, vol. 82, pp. 445-449, 1988.
- [52] S. Takayama, H. Sakura, K. Katsumobi, T. Wasada, Y. Iwamoto, "A Possible Involvement of Parasympathetic Neuropathy on Insulin Resistance in Patients

With Type 2 Diabetes”, *Diabetes Care*, vol. 24 (5), pp. 968-969, 2001.

[53] W. W. Lutt, “The HISS story overview: a novel hepatic neurohumoral regulation of peripheral insulin sensitivity in health and diabetes”, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 77, pp. 553-562, 1999.

[54] Jagmeet P. Singh, Martin G. Larson, Christopher J. O’Donnell, Peter F. Wilson, Hisako Tsuji, Donald M. Lloyd-Jones, Daniel Levy, “Association of Hyperglycemia With Reduced Heart Rate Variability (The Framingham Heart Study)”, *The American Journal of Cardiology*, vol. 86, pp. 309-312, 2000.

[55] K. De Angelis, B. D. Schaan, C. Y. Mae da, P. Dall’Ago, R. B. Wichi, M. C. Irigoyen, “Cardiovascular control in experimental diabetes”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 35, pp. 1091-1100, 2002.

[56] R. Taylor, “Type 2 Diabetes: Etiology and reversibility”, *Diabetes Care*, vol. 36, pp. 1047-1055, 2013.

[57] Emka Technologies, *iox v 2.9.5. user manual: Data acquisition & analysis for in-vitro & in-vivo studies*, Paris, França, 2015.

[58] T. M. d. C. C. A. Monteiro, “Avaliação funcional e farmacológica do corpo carotídeo do rato no envelhecimento”, Ph. D Dissertação, CEDOC, FCM-UNV, Lisboa, PT, 2011.

[59] Task Force of the European Society of Cardiology the North American Society of Pacing Electrophysiology, “Heart Rate Variability: Standards of Measurement, Physiological Interpretation, and Clinical Use”, *European Heart Journal*, vol.17, pp. 354-381, 1996.

[60] P. Konopelski, M. Ufnal, “Electrocardiography in Rats: a Comparison to Human”, *Physiol. Res.*, vol. 65, pp. 717-725, 2016.

[61] Y. Kawaue, J. Iriuchijima, “Changes in Cardiac Output and Peripheral Flows on Pentobarbital Anesthesia in the Rat”, *Japanese Journal of Physiology*, vol. 34, pp. 283-294, 1984.

[62] M. P. Guarino, A. I. Santos, M. Mota-Carmo, P. F. Costa, “Effects of Anaesthesia on Insulin Sensitivity and Metabolic Parameters in Wistar Rats”, *in vivo*, vol. 27, pp. 127-132, 2013.

[63] F. Valadas, “Estudo da Variabilidade da Frequência Cardíaca em contexto cirúrgico como elemento preditivo de complicações peri-operatórias”, M. S. Thesis, DF, Faculdade de Ciências e Tecnologia da universidade Nova de Lisboa, Caparica, Port., 2017.

[64] S. I. P. Silvestre, “Estudo da função autonómica através da variabilidade da frequência cardíaca em doentes sujeitos a cirurgia colo-rectal oncológica”, M. S.

Thesis, DF, Faculdade de Ciências e Tecnologia da universidade Nova de Lisboa, Caparica, Port., 2017.

[65] H. Y. Kim, "Statistical notes for clinical researches: assessing normal distribution using skewness and kurtosis", *Restor Dent Endod*, vol. 28 (1), pp. 52-54, 2013.

[66] J. D'Errico, *Interparc function*. url: <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/34874-interpar> (accedido em 01/07/2019).

[67] *Matlab & Simulink*. [Online]. Disponível em: <https://www.mathworks.com/products/matlab.html>. Acedido em: Julho, 01, 2019.

[68] "SPSS Step-by-Step Tutorial: Part 2", DataStep Development, 2004.

[69] J. Marôco, *Análise estatística com o SPSS Statistics*, 6ª Edição, Lisboa, 2014.

[70] I. Natário, *Probabilidade e Estatística*, Departamento de Matemática, Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, Portugal, 2016.

[71] S. Landau e B. S.Everitt, *A handbook of statistical analyses using SPSS*, London, UK: Chapman & Hall/CRC,2004.

[72] D. Normando, L. Tjaderhane e C. C. A. Quintão, "A escolha do teste estatístico – um tutorial em forma de apresentação em PowerPoint", *Dental Press J. Orthod*, vol. 15, n.º 1, pp. 101-106, 2010.

[73] D. G. Altman, *Practical Statistics for Medical Research*. Londo, UK: Chapman & Hall/CRC, 1991, pp. 54-63.

[74] K. C. Bilchick, R. D. Berger, "Heart Rate Variability", *J Cardiovasc Electrophysiol*, vol. 17, pp. 691-694, 2006.

[75] Janet M. Lemley, George R. Meneely, "Effects of Anoxia on Metabolism of Myocardial Tissue",

[76] Stanislaw Zajackowski, Tomasz Wierzba, "Time-Domain and Spectral Analysis of Heart Rate Variability in Rats Challenged with Hypoxia", *Computing in cardiology*, vol. 41, pp. 785-788, 2014.

[77] H. H. King, W. Janig, M. M. Patterson, *The Science and Clinical Application of Manual Therapy*. China: Elsevier, 2011, pp. 89-90.

## ANEXO I: COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DAS DIETAS

**Table S2– Composition of 60% lipid-rich diet**

<b>Composition</b>	<b>%</b>
<b>Protein</b>	<b>23.1</b>
Arginine	0.90
Histidine	0.67
Isoleucine	1.24
Leucine	2.24
Lysine	1.88
Phenylalanine	1.24
Tyrosine	1.31
Threonine	1.0
Valine	1.47
Aspartic Acid	1.66
Glutamic Acid	5.28
Proline	3.04
Serine	1.43
<b>Fat</b>	<b>34.9</b>
Cholesterol	301 ppm
Linoleic Acid	4.70
Linolenic Acid	0.39
Arachidonic Acid	0.06
Omega-3 Fatty Acids	0.39

Total Saturated Fatty A	13.68
Total Monounsaturated Fatty Acids	14.00
Polyunsaturated Fatty Acids	5.15
<b>Fiber (max)</b>	<b>6.5</b>
<b>Carbohydrates</b>	<b>25.9</b>
<b>Energy</b>	<b>5.10 kcal/g</b>
<b>From:</b>	<b>%</b>
Protein	18.1
Fat	61.6
<b>Minerals</b>	
Calcium	0.79
Phosphorus	0.59
Potassium	0.77
Magnesium	0.07
Sodium	0.15
Chloride	0.25
Fluorine	1.2 ppm
Iron	65 ppm
Zinc	46 ppm
Manganese	76 ppm
<b>Vitamins</b>	
Vitamin A	5.2 IU/g
Vitamin D-3 (added)	1.3 IU/g
Vitamin E	67.2 IU/kg
Vitamin K	0.65 ppm
Thiamin	6.2 ppm
Riboflavin	8.7 ppm
Niacin	39 ppm
Pantothenic Acid	21 ppm

**Table S4 – Composition of Standard diet**

<b>Composition</b>	<b>%</b>
--------------------	----------

<b>Proximate Analysis</b>	
Moisture	10.00
Crude Oil	4.16
Crude Protein	21.86
Crude Fibre	4.33
Ash	7.89
Nitrogen Free Extract	51.24
<b>Amino Acids</b>	
Arginine	1.39
Histidine	0.54
Isoleucine	0.96
Leucine	1.81
Lysine	1.30
Phenylalanine	1.20
Tyrosine	0.85
Alanine	0.27
Aspartic Acid	1.34
Glutamic Acid	4.30
Proline	1.53
Serine	0.98
<b>Fatty acids</b>	
Lauric	0.05
Myristic	0.17
Palmitic	0.37
Stearic	0.10
Myristoleic	0.01
Palmitoleic	0.09
Oleic	1.00
Linoleic	1.25
Linolenic	0.17
Arachidonic	0.12
<b>Fiber and Carbohydrates</b>	
Total Dietary Fibre	15.70
Pectin	1.47
Hemicellulose	9.33
Cellulose	4.04
Lignin	1.50
Starch	33.61
Sugar	5.84

<b>Energy</b>	
Gross Energy	15.10 MJ/kg
Digestible Energy	12.27 MJ/kg
Metabolizable energy	11.24 MJ/kg
Atwater Fuel Energy (AFE)	13.79 MJ/kg
AFE from Oil	11.35
AFE from Protein	26.51
AFE from Carbohydrate	62.13
<b>Minerals</b>	
Calcium	1.24
Phosphorus	0.80
Potassium	0.78
Magnesium	0.28
Sodium	0.24
Chloride	0.36
Fluorine	8.53 mg/kg
Iron	161.01 mg/kg
Zinc	46.90 mg/kg
Manganese	101.71 mg/kg
<b>Vitamins</b>	
Vitamin A	42522.66 IU/kg
Vitamin D-3 (added)	4369.41 IU/kg
Vitamin E	171.70 IU/kg
Vitamin K	40.72 mg/kg
Thiamin	49.77 mg/kg
Riboflavin	37.74 mg/kg

Disponíveis em: [www.mdpi.com/2072-6643/11/6/1197/s1](http://www.mdpi.com/2072-6643/11/6/1197/s1)

