

**Dissertação de Mestrado**

**Sistema para Medição da Velocidade de  
Células Vermelhas Sanguíneas na  
Microcirculação Utilizando a Técnica de  
Correlação Cruzada**

**Jayme Alves de Mesquita Júnior**

**CENTRO BRASILEIRO DE PESQUISAS FÍSICAS**

**Rio de Janeiro, 2º semestre de 2006**

Dissertação submetida à Coordenação de Formação Científica como requisito  
para obtenção do grau de Mestre em Instrumentação Científica.

Orientadores

Eliane Wajnberg (CBPF) e Pedro Lopes de Melo (UERJ)

Ao meu pai Jayme Alves de Mesquita e  
minha mãe Salidocil de Souza Mesquita.  
*In memoriam*

Uma grande caminhada começa  
sempre com um pequeno passo.

Allan Kardec

# Agradecimentos

- Em primeiro lugar a Deus, pois sem ele eu não teria conseguido chegar até aqui.
- Agradeço aos meus pais por ter me propiciado a oportunidade de uma boa educação.
- As minhas irmãs: Elisa, Jacilene, Jocélia e Eliane, por sempre me incentivarem nos estudos.
- A professora Eliane Wajnberg e ao professor Pedro Lopes de Melo pela orientação.
- A professora Eliete Bouskela que sempre acreditou no meu trabalho e me deu a oportunidade de desenvolver este trabalho e pelo suporte que possibilitou a implantação do sistema.
- Ao Laboratório de Instrumentação Biomédica e ao Laboratório de Pesquisas em Microcirculação da UERJ que possibilitaram a implementação do instrumento.
- Ao professor Dr. Geraldo Cernicchiaro pelo apoio no encaminhamento da tese.
- Aos pesquisadores do LPM: Fátima Cirino, Fabiana Gomes e Cristiane Conde pelo apoio na preparação dos experimentos e pelas trocas de conhecimentos que foram de fundamental importância para o desenvolvimento do projeto.

- Agradeço aos meus amigos Josiel G. Santos e Álvaro Camilo pelos auxílios em todo o tempo e pelas conversas úteis.
- Agradeço a todos os técnicos e pesquisadores do LPM e do LIB.

# Resumo

Um velocímetro ótico empregando a técnica de correlação cruzada foi desenvolvido para medir a Velocidade de Células Vermelhas Sanguíneas (RBCs) na microcirculação de pequenos animais. A imagem magnificada do vaso sob investigação é projetada no plano focal de uma lente objetiva do microscópio e alinhada dentro de duas janelas ópticas colocadas numa distância conhecida ( $d$ ). Com a passagem das RBCs, dois sinais similares, porém atrasados no tempo são gerados. A determinação do tempo de passagem das RBCs ( $t_t$ ) é utilizado para a realização da medida indireta da velocidade das RBCs ( $V_r = d / t_t$ ). O instrumento apresenta uma etapa de processamento analógico, a qual é composta por um estágio de amplificação, um de filtragem analógica e uma placa de adquirir dados. As etapas de processamento digital são filtragem digital, correlação cruzada, uma para estimativa do atraso, estimativa da velocidade e apresentação visual. Resultados *in vitro* obtidos um com modelo elétrico apresentaram erros menores que 1%. Resultados obtidos em medidas *in vivo* apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,002$ ) quando comparados diferentes vasos da rede microvascular. Estes resultados são coerentes com a fisiologia envolvida e confirmam o alto potencial científico do sistema desenvolvido.

# Abstract

An optical velocimeter employing the cross correlation technique has been developed in order to measure the Red Blood Cells (RBCs) velocity in the microcirculation of small animals. The magnified image of the vessel under investigation is projected on the focal level of the objective lens of the microscope and aligned between two optical windows placed at a known distance ( $d$ ). The passage of RBCs generates two similar delayed signals. The determination of the time of passage of the RBCs ( $t_t$ ) is used to calculate the RBCs velocity ( $V_r = d / t_t$ ). The instrument consists of an analog processing stage, including amplification and filtering, and a data acquisition system. The software includes digital filtering, cross correlation, estimation of time delay and RBC velocity, and visual presentation. In studies concerning performance evaluation, analysis of electrical models presented errors less than 1%, while measurements "*in vivo*" presented significant differences ( $p < 0,002$ ) when different kind of microcirculatory vessels are compared. These results are consistent with the physiologic conditions studied and confirmed the high scientific potential of the developed system.

# Índice

<b>Capítulo I .....</b>	<b>1</b>
1.Introdução .....	1
1.1 Relevância do Projeto .....	2
1.1.1 Reflexos sociais e econômicos das doenças circulatórias .....	2
1.2 Objetivo do Projeto .....	4
 <b>Capítulo II – Revisão Teórica .....</b>	 <b>5</b>
2.1 Sistema Circulatório .....	5
2.1.2 Partes Funcionais da circulação .....	5
2.1.3 Componentes do sangue .....	8
2.1.4 Hemodinâmica .....	11
2.1.4.1 Velocidade da corrente Sanguínea .....	12
2.1.5 Microcirculação .....	15
2.1.5.1 Microcirculação da Bolsa da Bochecha .....	19
2.1.6 Auto-Regulação .....	21
2.1.7 Resistência ao fluxo e queda de pressão ao longo da microcirculação .....	21
2.2 Técnicas de Medida de Fluxo na Microcirculação .....	23
2.2.1 Método de Varredura de Imagem .....	23
2.2.2 Método de Imagem de Raia .....	24
2.2.3 Método de Dupla Fenda .....	25
2.2.4 Método de Dupla Janela .....	25
2.2.5 Prisma de Grades e Matrizes .....	26
2.2.6 Correlação Espacial .....	27
2.2.7 Técnica de Correlação Cruzada .....	28

2.2.8 Correlação de Dados Amostrados .....	30
2.3 Técnicas de Sensoriamento .....	31
2.4 Coeficiente de Correlação .....	32

## **Capítulo III – Materiais e Métodos ..... 34**

3.1 Descrição do equipamento de medida de fluxo .....	34
3.2 Implementação do Sistema .....	37
3.2.1 Parâmetros Básicos .....	37
3.2.1.1 Espaçamento entre os Sensores .....	38
3.2.1.2 Velocidades Mínima e Máxima .....	38
3.2.1.3 Erro no pior caso .....	38
3.2.1.4 Resolução Temporal .....	40
3.2.1.5 Faixa do Instrumento .....	40
3.2.1.6 Determinação dos Atrasos .....	41
3.3 Diagrama em Blocos do Correlator .....	42
3.3.1 Sistema Óptico .....	43
3.3.2 Estágio de Amplificação .....	43
3.3.3 Interface A/D .....	46
3.3.4 Filtro Passa Baixa “ <i>anti-aliasing</i> ” .....	47
3.3.5 Filtragem Digital .....	50
3.3.6 Correlação Cruzada .....	52
3.3.7 Estimativa do Atraso.....	53
3.3.8 Estimativa da Velocidade .....	53
3.4 Programa de Aquisição e Processamento .....	53
3.5 Testes em modelos elétricos .....	58
3.6 Teste da resposta do correlator ao degrau .....	60
3.7 Calibração do instrumento .....	61
3.8 Resposta do instrumento ao degrau .....	62
3.9 Preparação experimental .....	63

<b>Capítulo IV – Resultados e Discussão .....</b>	<b>66</b>
4.1 Teste em modelo elétrico para avaliação dos erros no sub-sistema de correlação .....	66
4.2 Resultado da calibração <i>in Vitro</i> .....	66
4.3 Resposta do correlator ao degrau .....	67
4.4 Resposta do Instrumento ao degrau .....	69
4.5 Padrões dos sinais microcirculatórios no tempo .....	70
4.6 Testes <i>in Vivo</i> .....	71

<b>Capítulo V – Conclusões .....</b>	<b>76</b>
--------------------------------------	-----------

<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>78</b>
-----------------------------------------	-----------

<b>Anexos .....</b>	<b>88</b>
---------------------	-----------

**A** – Trabalho apresentado no XX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica.

**B** – Fluxograma do programa para aquisição de dados e processamento dos sinais.

**C** – Diagrama da unidade de processamento analógico.

## **Lista de Figuras**

Figura 1 – Arranjos dos vasos que compõem o Sistema Circulatório.

Figura 2 – Dimensões e forma de uma RBC humana.

Figura 3 – Modificações de geometria de uma RBC.

Figura 4 – RBCs passando através de um capilar.

Figura 5 – Imagem da microvasculatura ótica da bolsa da bochecha do hamster.

Figura 6 – Desenho da microcirculação humana.

Figura 7 – Padrão da microcirculação da bolsa da bochecha do hamster.

Figura 8 – Microcirculação da bolsa da bochecha do hamster *in Natura*.

Figura 9 - Gráfico da variação da pressão sanguínea nos diferentes segmentos do sistema circulatório da bolsa da bochecha de um hamster.

Figura 10 – Representação da instrumentação empregada na medida de fluxo sanguíneo.

Figura 11 – Diagrama em bloco do sistema utilizado na medida de velocidade.

Figura 12 – Descrição do sistema montado no laboratório.

Figura 13 – Descrição do instrumento desenvolvido na dissertação.

Figura 14 – Posicionamento da bolsa da bochecha no microscópio.

Figura 15 – Diagrama em blocos do correlator.

Figura 16– Figura do conjunto ótico para detecção da passagem das RBCs.

Figura 17 – Estágio de amplificação.

Figura 18 – Curvas de filtro Butterworth.

Figura 19 - Filtro ativo passa-baixa de 5ª ordem, Butterworth.

Figura 20 – efeito da iluminação do microscópio.

Figura 21 – Sinais de interferências da lâmpada do microscópio após filtragem digital.

Figura 22 – Diagrama em blocos do programa de aquisição e processamento.

Figura 23 – Painel frontal do programa de aquisição e processamento.

Figura 24 – Painel frontal do programa de aquisição dos sinais microcirculatórios no tempo.

Figura 25 – Diagrama em blocos da linha de retardo.

Figura 26 – Esquema do filtro passa-baixas.

Figura 27 – Descrição do aparato utilizado para calibração do correlator.

Figura 28 - Figura do aparato utilizando para avaliar a performance dinâmica do correlator.

Figura 29 – Foto da preparação experimental da bolsa da bochecha do hamster.

Figura 30 – Curva de calibração do instrumento.

Figura 31 – Curvas de resposta ao degrau utilizando médias.

Figura 32 – Curva de resposta ao degrau do instrumento.

Figura 33 - Formas de Ondas no domínio do tempo dos vasos microcirculatórios.

Figura 34 – Painel frontal do programa mostrando um processamento em tempo real em uma artéria.

Figura 35 – Gráfico das velocidades obtidas nas medidas *in Vivo*.

Figura 36 - Área de seção transversal estimada e velocidades lineares do diferentes tipos de vasos.

# Lista de Símbolos

$f$	- Freqüência
$V$	- Velocidade
$M$	- Magnificação do sistema ótico
$X_0$	- Distância da janela ótica
$\tau$	- Atraso de tempo entre os sinais
$R_{xy}$	- Função de correlação cruzada
$C_{xy}$	- Covariância cruzada
$\rho_{xy}$	- Coeficiente de correlação
$R_{xx}$	- Função de auto-correlação
$R_{yy}$	- Função de auto-correlação
$E$	- Esperança ou média
$\delta$	- Intervalo de amostragem
$R_g$	- Faixa do correlator
$V_{out}$	- Tensão de saída do amplificador operacional
$V_{IO}$	- Tensão de off-set
$A_v$	- Ganho de tensão
$B$	- Banda passante do sinal
$T$	- Tempo em que o sinal foi adquirido
$N$	- Número de amostras adquiridas
$f_0$	- Freqüência de corte do filtro
$\omega$	- Freqüência angular

$T_s$	- Intervalo de amostragem
$T_V$	- Período do ciclo de vasomoção
$D$	- Diâmetro do vaso sanguíneo
$d$	- diâmetro de um tubo
$R$	- Resistência do vaso sanguíneo

# Lista de Siglas

AD	- Analog Devices
RBC	- Células Vermelhas Sanguíneas
ADC	- Conversor Analógico/Digital
DAC	- Conversor Digital/Analógico
DCV	- Doença Cardiovascular
CFTV	- Circuito Fechado de TV

# Lista de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros do sistema.

Tabela 2 - Parâmetros derivados a partir da tabela 1.

Tabela 3 – Resultados da avaliação no modelo elétrico.

# Capítulo I

## Introdução

A medida de velocidade de fluxo sanguíneo na microcirculação é um fator importante para a determinação da oxigenação sanguínea e da concentração de hemoglobina. Avaliações da velocidade de eritrócitos encontram aplicações em diversos estudos relacionados à fisiologia da microcirculação (Fleming, Klitzman e Johnson, 1985). Em decorrência disso, diversos pesquisadores no decorrer dos anos, vem desenvolvendo técnicas que possibilitem a medição de fluxo sanguíneo ao nível da microcirculação.

O estudo do transporte do oxigênio na microcirculação inclui a quantificação e análise da rapidez de movimentação da hemoglobina. Assim, é importante o desenvolvimento de métodos convenientes pelos quais o fluxo de RBCs possa ser determinado (Anand, Shruti e Pittman, 1999).

Em certas doenças como no diabetes, acredita-se que o distúrbio no balanço entre a pressão capilar e o fluxo capilar pode ocorrer precocemente no processo de evolução da doença, podendo estar envolvido na formação das complicações clínicas. A fim de entender o mecanismo envolvido, é fundamental o completo conhecimento do sistema circulatório em condições não patológicas (Mawson e Shore, 1998).

## **1.1 – Relevância do Projeto**

### **1.1.1 - Reflexos sociais e econômicos das doenças circulatórias**

A pesquisa realizada por Murray e Lopez (1997) mostrou que as doenças cardiovasculares (DCVs) representaram a principal causa de falecimento no mundo em 1990 e, segundo a projeção efetuada por estes pesquisadores, esta liderança será mantida até 2020.

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) do ano de 1997 revelaram que as DCVs foram responsáveis por cerca de 30% de todas as mortes que ocorreram no mundo, correspondendo a quase 15 milhões de óbitos por ano, sendo a maioria deles (9 milhões) em países em desenvolvimento (Brandão, 2000).

No Brasil, as DCVs são responsáveis por grande número de óbitos prematuros em adultos. Além da elevada morbidade, levam na maioria das vezes, à invalidez parcial ou total do indivíduo, com graves repercussões para a pessoa acometida, sua família e a sociedade. Dados reportados pelo Ministério da Saúde demonstraram que do total de 809.799 óbitos registrados em 1984, 209.288 foram de origem cardiovascular, sendo que, 20% dos óbitos foram de adultos jovens entre os 20 e 49 anos de idade e 41,2% foram entre aqueles na faixa dos 50 ou mais anos (Ministério da Saúde, 1988).

Apesar dos significativos aprimoramentos no tratamento e diagnóstico das doenças cardíacas, estas se mantiveram como a principal causa de falecimento nos Estados Unidos (Bronzino, 1986). Em 1980 mais de um milhão de americanos

faleceram em função de complicações associadas ao coração ou aos vasos sangüíneos. Em 1983, a *American Heart Association* estimou que mais de US\$ 32 bilhões foram gastos ou perdidos devido às doenças cardiovasculares.

Lindén (1997) reportou que, para entender melhor os mecanismos fisiopatológicos de doenças que afetam o fluxo sanguíneo na microvasculatura e para estudar quais níveis na microvasculatura as drogas vaso-ativas interferem no fluxo sanguíneo, é necessário o desenvolvimento de técnicas não-invasivas para investigações tanto clínicas quanto experimentais.

Acredita-se que a rede capilar e as conexões arteriovenosas podem conter a chave para muitos dos problemas associados às doenças vasculares, incluindo hipertensão. Deste modo, é essencial o aprimoramento dos métodos de estudo do fluxo sangüíneo nesta importante parte da circulação.

A maioria dos sistemas utilizados na avaliação da velocidade de fluxo sanguíneo na microcirculação emprega técnicas baseadas em sistemas analógicos (Intaglietta e Tompkins, 1971; Intaglietta, Monti e Tompkins, 1974; Borders, Brown e Granger, 1983; Fleming, Klitzman e Johnson, 1985). Brånemark e Johnson, (1963), desenvolveram um método de mancha voadora que utiliza técnicas de vídeo. Munro, (1966), desenvolveu um método ótico baseado em prisma rotativo. Estes métodos, no entanto, dependem da habilidade do pesquisador e são limitados pelo fato de que somente uma única célula pode ser seguida no campo de visualização (Johnson, 1968).

Fleming, Klitzman e Johnson (1985), desenvolveram um método baseado num detector diferencial periódico e análise espectral. Estes pesquisadores reportaram que existem potenciais dificuldades em aplicações práticas do método,

em virtude do período de amostragem finita do sinal e também devido a variações na velocidade durante a amostragem terem produzido um espalhamento espectral, dificultando a determinação da frequência fundamental.

Wayland e Johnson (1967) desenvolveram o método de dupla fenda, que permite gravações contínuas da velocidade e não depende da habilidade do pesquisador. No entanto, este método depende de gravação em fita magnética.

## ***1.2 – Objetivo do Projeto***

Neste contexto, este projeto objetiva desenvolver um sistema baseado no método de correlação cruzada que possibilite a medição da velocidade das hemácias na microcirculação de pequenos animais. O sistema deverá permitir avaliações em tempo real, armazenamento automático dos resultados e operação mais simples que seus correspondentes analógicos.

# Capítulo II

## Revisão Teórica

### **2.1 – Sistema Circulatório**

O sistema circulatório é responsável pelo transporte e distribuição de substâncias essenciais aos tecidos e pela remoção dos produtos originados do metabolismo (Berne *et al*, 2004). A função da circulação é manter um ambiente apropriado, em todos os líquidos dos tecidos do corpo, para as condições ótimas de sobrevivência e de funcionamento das células (Guyton e Hall, 2002). Este sistema também participa dos mecanismos homeostáticos, como a regulação da temperatura corpórea, manutenção de fluídos e suprimento de oxigênio e nutrientes sob vários estados fisiológicos (Berne *et al*, 2004).

#### **2.1.2 – Partes Funcionais da Circulação**

A figura 1 apresenta um esquema simplificado da circulação humana com as correspondentes porcentagens de sangue nas suas diferentes partes (Guyton e Hall, 2002). O papel de cada um destes componentes é descrito sucintamente a seguir.

**Artérias:** sua função é transportar o sangue para os tecidos, sob alta pressão. São divididas dentro de duas categorias: elástica e muscular. Artérias com diâmetros grandes (aorta e carótida), onde em média contêm tanto células de

musculatura lisa quanto muitas camadas elásticas são chamadas de artérias elásticas. As artérias que diminuem de diâmetro quando se aproximam da periferia e as quais em média são menos elásticas, e as células de musculatura lisa predominam são chamadas de artérias musculares.

**Arteriolas:** são os últimos ramos pequenos do sistema arterial, atuando como válvulas controladoras, através das quais o sangue é liberado para os capilares. A arteríola tem parede muscular forte, que pode fechar completamente, ou pode dilata-la, por várias vezes, em relação ao seu diâmetro, tendo assim a capacidade de alterar intensamente o fluxo sangüíneo, para os capilares, em resposta às necessidades dos tecidos. O diâmetro das arteriolas varia em torno de 5-100  $\mu\text{m}$  e tem uma camada lisa espessa, uma camada adventícia fina e um revestimento endotelial. As arteriolas dão origem aos capilares (5 a 10 $\mu\text{m}$  de diâmetro), ou em alguns tecidos, as metarteriolas (10 a 20  $\mu\text{m}$  em diâmetro) que dão origem a capilares. As arteriolas representam o maior local de resistência para a regulação do fluxo de sangue local (Berne *et al*, 2004).

**Capilares:** a função dos capilares é realizar a troca de líquido, nutrientes, eletrólitos, hormônios e outras substâncias entre o sangue e o líquido intersticial. Para realizar esse papel, as paredes dos capilares são muito delgadas e têm inúmeros e minúsculos *poros capilares*, permeáveis à água e a outras pequenas substâncias moleculares (Guyton e Hall, 2002).

A densidade capilar está fortemente relacionada com as necessidades metabólicas dos tecidos e órgãos. Nos tecidos ativos, como o cardíaco, esquelético, muscular e glandular, a densidade capilar é alta. Nos tecidos cuja atividade metabólica é baixa, como o tecido subcutâneo, ou o cartilaginoso, a densidade capilar é baixa (Berne *et al*, 2004).

**Vênulas:** as vênulas coletam o sangue dos capilares; gradualmente, as vênulas unem-se, formando veias progressivamente maiores. As vênulas imediatamente após os capilares atingem diâmetros entre 10-50  $\mu\text{m}$  e, inicialmente, não apresentam células musculares em suas paredes.

**Veias:** atuam como condutos para o transporte do sangue dos tecidos de volta ao coração. Aproximadamente 60% de todo o sangue do sistema circulatório está contido nas veias, desse modo, elas também atuam como reservatório de sangue para a circulação. Como a pressão no sistema venoso é muito baixa, suas paredes são delgadas. Mesmo assim, apresentam musculatura para se contrair, ou se expandir, e, assim, atuam como reservatório controlável de sangue extra, em quantidades pequenas ou grandes, dependendo das necessidades da circulação.

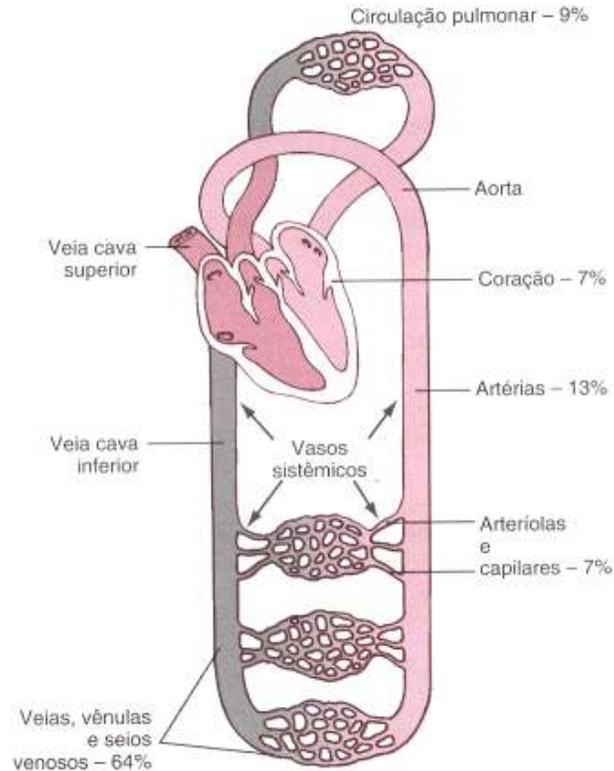


Figura 1. Esquema dos arranjos dos vasos que compõem o sistema circulatório com suas respectivas distribuições do sangue (em percentagens de sangue total) nas diferentes partes do sistema circulatório. Adaptado de Guyton e Hall (2002).

### 2.1.3 – Componentes do Sangue

O sangue é uma suspensão de células vermelhas sanguíneas (eritrócitos-RBCs), células vermelhas brancas (leucócitos), e plaquetas no plasma (Pal, 2003). Na microcirculação as propriedades (deformabilidade, aumento do volume de RBCs, agregação de RBCs nas paredes dos vasos) das células sanguíneas vermelhas tem uma importante influência no fluxo sanguíneo.

**Células Vermelhas Sanguíneas:** as RBCs são discos bicôncavos com cerca de 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 1  $\mu\text{m}$  de espessura no centro, tendo espessura máxima de 2,5

$\mu\text{m}$  (Skalak, Ozkaya e Skalak, 1989). As dimensões de uma RBC humana são mostradas na figura 2 (Evans e Fung, 1972). As RBCs consistem de uma fina membrana elástica cheia com uma solução de hemoglobina.

As RBCs são altamente deformáveis, uma característica que permite que elas passem através dos capilares (Pal, 2003). A figura 3 mostra uma RBC passando através de um canal com diâmetro de  $3 \mu\text{m}$ , onde a alta deformabilidade da sua membrana permite uma flexibilidade suficiente para que uma RBC passe através de capilares com diâmetro inferior ao próprio diâmetro da RBC (Chien, 1975). A figura 4 mostra RBCs passando através de um capilar com fluxo em fila única. Quando uma RBC se move num capilar cônico, o comprimento dela aumentará. Em certos diâmetros de capilares, a forma da RBC será completamente cilíndrica.

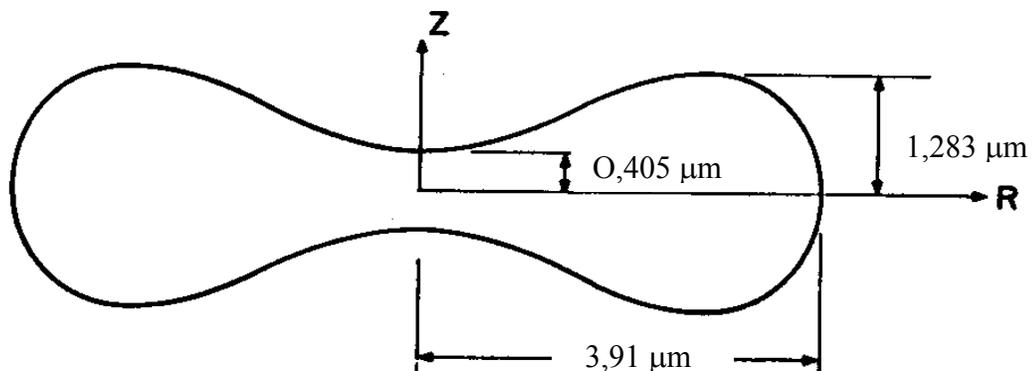


Figura 2. Dimensões e forma de uma RBC humana típica (adaptado de Evans e Fung, 1972).



Figura 3. Modificações de geometria durante a passagem de uma RBC humana através de um canal cilíndrico com diâmetro de 3  $\mu\text{m}$  (adaptado de Chien, 1975).

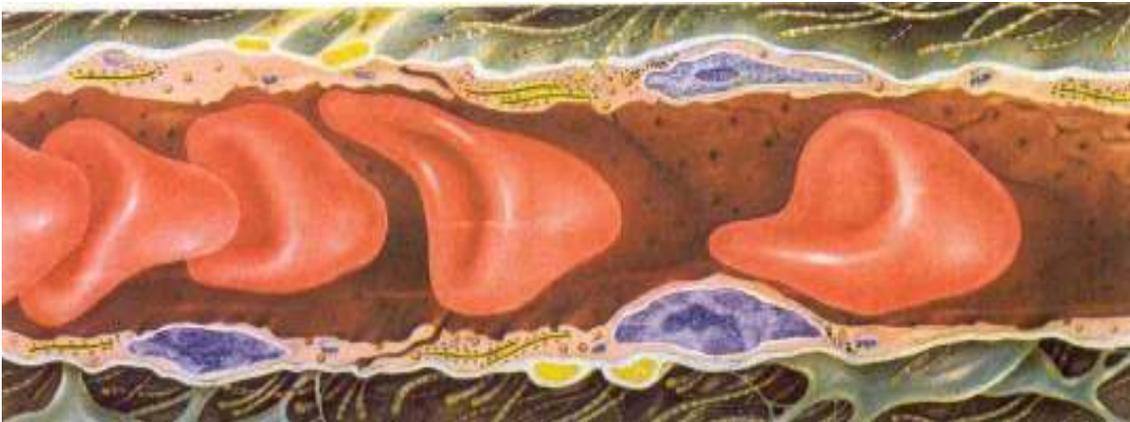


Figura 4. Ilustração das RBCs fluindo ao longo de um capilar em alta velocidade.

Adaptado de Schmid-Schönbein (1976).

**Leucócitos:** os leucócitos (células sangüíneas brancas) constituem menos de 1% do volume total de células sangüíneas nos humanos. O diâmetro médio dos leucócitos varia entre 6 e 7,5  $\mu\text{m}$ . Os leucócitos são menos deformáveis que as RBCs e sua função primária é a defesa do corpo e reações imunológicas (Slaaf, Tangelder e Reneman, 1993).

**Plaquetas:** as plaquetas ocupam um volume ainda menor em relação aos leucócitos e normalmente tem pouco efeito na viscosidade sangüínea. As plaquetas são corpos irregulares esféricos ou ovais sem núcleo (Pal, 2003). Elas possuem uma dimensão de aproximadamente 2-4 $\mu\text{m}$  e desempenham um papel importante na coagulação do sangue e na cicatrização dos vasos sangüíneos feridos (Pal, 2003).

#### **2.1.4 – Hemodinâmica**

De acordo com a literatura, é difícil analisar precisamente o fluxo pulsátil do sangue através do sistema cardiovascular (Berne *et al*, 2004), pelo coração ser uma bomba complexa e seu funcionamento ser afetado por fatores químicos e físicos. Os vasos sangüíneos são multiramificados e suas elasticidades asseguram variações complexas na suas dimensões. Outro fato, é que o sangue não é uma solução simples, homogênea, mas, ao invés, é uma suspensão complexa de corpúsculos sangüíneos brancos e vermelhos, plaquetas e glóbulos lipídicos dispersos numa solução de proteínas.

Em certas condições, torna-se difícil a compreensão de como o fluxo sanguíneo é controlado, em função das necessidades dos tecidos. Também não é simples a compreensão de como o coração e a circulação são controlados, para suprir adequadamente débito cardíaco e pressão arterial, para fazer com que ocorra o necessário fluxo sanguíneo (Berne *et al*, 2004).

#### **2.1.4.1 – Velocidade da Corrente Sangüínea**

Diversos trabalhos reportaram uma distribuição não uniforme de células sangüíneas entre capilares na rede microvascular (Goodman *et al*, 1974; Gaehtgens *et al*, 1976 e Gore e Bohlen, 1975). Em qualquer dado intervalo de tempo, a distribuição de RBCs dentro da microcirculação aparece em diferentes espaçamentos nos capilares. Assim, um capilar pode transportar um grupo de RBCs em um dado intervalo de tempo e somente plasma e plaquetas em outro tempo. Este transporte de RBCs gera uma considerável não homogeneidade espacial e temporal na distribuição de células sangüíneas na microcirculação. Esta não homogeneidade faz com que a velocidade do fluxo na microcirculação também exiba significantes flutuações espaciais e temporais (Johnson, 1968 e Fenton, 1980).

Estudos feitos na microcirculação revelaram que o diâmetro dos vasos, assim como o fluxo, variam continuamente, podendo até mesmo ser interrompido. Esta variação no fluxo é chamada de vasomoção. Os ciclos de vasomoção variam, dependendo do tecido e da espécie animal, na faixa de 2 segundos a 1 minuto (Slaaf, Tangelder e Reneman, 1993).

O fator mais importante que leva ao aumento ou diminuição do fluxo sangüíneo é a demanda de oxigênio para os tecidos. Quando o consumo de oxigênio é alto, há uma queda no oxigênio tecidual, os ciclos de vasomoção ocorrem com maior freqüência por períodos de tempo maiores, fazendo assim com que o sangue transporte quantidades maiores de oxigênio e outros nutrientes para os tecidos.

A energia para propulsão do sangue pelo sistema cardiovascular é provida pelo coração que impõe um gradiente de pressão ao longo do comprimento do vaso (Eugene e Charles Miguel, 1984). Em condições de fluxo laminar, o fluxo ( $F$ ) através de um vaso está relacionado com a pressão  $\Delta P$  sobre o vaso, conforme descrito pela lei de Poiseuille (Slaaf, Tangelder e Reneman, 1993).

$$F = \frac{\pi D^4 \Delta P}{128 \mu l} \quad (1)$$

onde  $D$  é o diâmetro do vaso,  $l$  é o comprimento do vaso sobre o qual a diferença de pressão  $\Delta P$  existe, e  $\mu$  é o coeficiente de viscosidade dinâmica do fluido. Assumindo que as propriedades reológicas do sangue são constantes (viscosidade dinâmica  $\mu$  constante), a equação 1 mostra que o fluxo sangüíneo está diretamente relacionado com a quarta potência do diâmetro do vaso. Para gradientes de pressão constante ao longo do vaso, o fluxo sangüíneo médio pode ser calculado pela equação 2.

$$\mathbf{F} = \beta \frac{\int_0^{T_v} D^4(t) dt}{T_v} \quad (2)$$

onde  $T_v$  é o período de vasomoção e  $\beta$  é um fator de proporcionalidade. Da equação 2, pode-se observar que pequenas mudanças no diâmetro de um vaso causam grandes alterações na capacidade do vaso de conduzir sangue (Guyton e Hall, 2002). O diâmetro de um vaso sanguíneo é então, o principal fator na determinação da velocidade do fluxo sanguíneo pelo vaso. Qualquer obstrução nas artérias, ou uma pequena mudança no raio das artérias pode significar um enorme esforço para o coração conseguir bombear sangue na mesma quantidade pelo corpo.

Nas pequenas arteríolas, que dão origem direta aos capilares, encontram-se as maiores resistências ao fluxo sanguíneo, em virtude desses vasos serem responsáveis pelo controle do fluxo sanguíneo local através de sua dilatação e constrição.

O controle do fluxo sanguíneo nos tecidos locais desempenha um papel importante, pois se não existisse este controle, o coração deveria suprir esta necessidade, atingindo todos os órgãos. Desta forma, o fluxo sanguíneo é regulado ao nível mínimo capaz de suprir as necessidades dos tecidos (Guyton e Hall, 2002).

Outro fator importante na variação do fluxo, como se observa na lei de Poiseuille, é a viscosidade do sangue. Quanto maior for a viscosidade menor será o fluxo sanguíneo em um vaso. Como 99% do particulado sanguíneo é constituído de RBCs, estas determinam a viscosidade do sangue, exercendo retardo por atrito contra outras células adjacentes e contra a parede do vaso sanguíneo.

### 2.1.5 – Microcirculação

A microcirculação compreende os vasos sanguíneos e linfáticos com diâmetro inferior a 100  $\mu\text{m}$ : artérias terminais, metarteríolas, capilares, vênulas não musculares, vênulas musculares, veias, capilares linfáticos e microlinfáticos, (Bouskela, 1999). É conceituada como a circulação do sangue através dos menores vasos do corpo (Berne *et al*, 2004). A figura 5 mostra a microvasculatura da microcirculação da bolsa da bochecha do *hamster Mesocricetus auratus* realçada pela fluorescência-dextran (*FITC-Dextran*), (figura 5A). Inúmeros fenômenos fundamentais para a sobrevivência dos organismos ocorrem ao nível da microcirculação. A figura 6 descreve a microcirculação de um humano, e nela pode-se observar que as arteríolas dão origem direta aos capilares responsáveis pelo abastecimento de nutrientes aos tecidos.

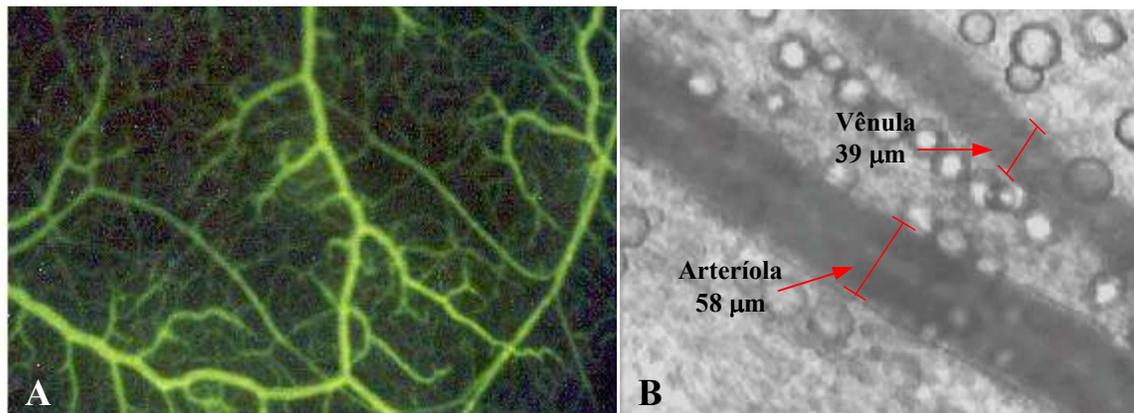


Figura 5. Imagem da microvasculatura ótica da bolsa da bochecha do *hamster (Mesocricetus auratus)* realçada pela fluorescência do Isotiocianato de Fluoresceína-Dextrana (*FITC-Dextran*) (A) e Microcirculação do *hamster* com seus respectivos diâmetros sem a substância fluoresceína (B).

Os microvasos são partes estruturais e funcionais dos tecidos que eles abastecem. A densidade capilar está fortemente relacionada com as necessidades metabólicas, especialmente a demanda de oxigênio para o tecido (Slaaf, Tangelder e Reneman, 1993).

A rede arterial avança em direção ao sistema capilar através de ramificações progressivas onde condutos predominantemente elásticos gradualmente se tornam vasos cujo diâmetro é diretamente controlado pelo tônus da musculatura lisa (Bouskela, 1999). A maior quantidade de células musculares lisas na parede vascular é alcançada pelas arteríolas e arteríolas terminais ou metarteríolas, onde as proporções são tais que a contração ou o relaxamento destas células pode levar estes vasos da dilatação máxima até o fechamento, quando, então, eles deixam de funcionar como conduto para o transporte de sangue.

Na microcirculação, como o diâmetro dos microvasos diminui, a resistência ao fluxo nos microvasos individuais aumenta consideravelmente. Da equação (1), pode-se observar que grandes resistências ao fluxo são encontradas nos microvasos muito estreitos, precapilares e capilares.

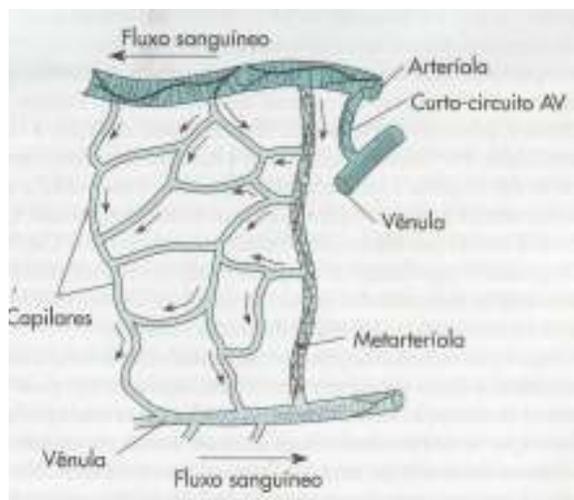


Figura 6. Desenho esquemático da microcirculação humana. As estruturas circulares, na arteriola e na vênula, representam fibras musculares lisas, e as linhas contínuas ramificadas representam fibras nervosas simpáticas. As setas indicam a direção do fluxo sanguíneo. Adaptado de Berne *et al*, 2004.

Nas arteríolas terminais, que dão origem diretamente aos capilares, o fluxo sanguíneo freqüentemente apresenta paradas completas, fenômenos que ocorrem por um curto período de tempo. Nas grandes arteríolas, as quais fornecem sangue para várias arteríolas terminais, o fluxo também varia, mas dentro das condições normais nunca se aproxima de zero. Durante o período em que o fluxo capilar é zero, o sangue pode contornar o leito capilar através de desvios arteriovenosos, que carregam o sangue diretamente das arteríolas para as vênulas. Desvios alternativos, denominadas de desvios funcionais, são criados em certos capilares que carregam sangue continuamente devido à baixa resistência relativa destes vasos quando comparada com os capilares vizinhos. (Simionescu e Simionescu, 1984; Wiedeman, 1984).

O fluxo sanguíneo através dos capilares mantém gradientes de concentração de solução e pressão hidrostática entre o leito do capilar e os tecidos ao redor. As trocas transcapilares envolvem, por exemplo, oxigênio, nutrientes, dióxido de carbono, metabólicos e fluídos. As drenagens dos fluídos dos tecidos pelos microvasos são assistidos pelos vasos linfáticos. Os capilares linfáticos são sacos cegos consistindo de células endoteliais com pequenas junções abertas para entrada do material dos tecidos aos redores.

Em cada região, a microcirculação apresenta-se organizada de modo a atender às necessidades específicas dos órgãos. A importância de um fluxo de sangue adequado se deve aos fatores abaixo relacionados:

1. Suprimento de oxigênio aos tecidos;
2. Suprimento de outros nutrientes, como glicose, aminoácidos, ácidos graxos etc;
3. Remoção de dióxido de carbono e de íons hidrogênio dos tecidos;
4. Manutenção de concentrações apropriadas de outros íons nos tecidos;
5. Transporte de vários hormônios e outras substâncias específicas para os diferentes tecidos.

Além disso, certos órgãos têm necessidades especiais. Por exemplo, o fluxo sanguíneo para a pele determina a perda de calor do organismo e, dessa maneira, ajuda a controlar a temperatura do corpo (Guyton e Hall, 2002). O suprimento de quantidades adequadas de plasma sanguíneo para os rins permite a estes órgãos excretar os produtos de degradação do organismo (Guyton e Hall, 2002).

Um distúrbio na microcirculação é caracterizado pela redução do fluxo de sangue nos capilares, pelas mudanças no diâmetro do vaso e pela elevada ou

reduzida troca dos fluídos transcapilares. Estes distúrbios estão envolvidos na maioria dos processos patológicos, sendo freqüentemente um componente importante da fisiopatologia de doenças sistêmicas.

#### **2.1.5.1 – Microcirculação da Bolsa da Bochecha do Hamster**

O animal utilizado neste trabalho para pesquisas de fluxo microcirculatório é o *hamster* dourado (*Mesocricetus auratus*), com massa corporal em torno de 100 g. Estes animais são mantidos no biotério do Laboratório de Pesquisas em Microcirculação (LPM) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), UERJ, com ciclos dia/noite, temperatura e umidade controlados. Esta espécie é a mais comumente utilizada em pesquisas biológicas e médicas. Este animal é uma espécie de mamífero que apresenta uma membrana acessível na bolsa da bochecha com espessura em torno de 0,4  $\mu\text{m}$  (Priddy e Brodie, 1984). A membrana é relativamente transparente, o que possibilita a sua utilização para estudos *in vivo* da microcirculação e dos elementos que compõem o sangue nos vasos sanguíneos vivos.

Wiedeman (1963) descreveu o padrão da microcirculação da bolsa da bochecha do *hamster*, a qual foi caracterizada como um tecido cutâneo, sem vasos linfáticos visíveis, sem células musculares e com uma rede difusa de nervos. A bolsa da bochecha possui uma distribuição difusa de vasos arteriais com numerosas ramificações pequenas sem padrões definidos. Muitos vasos venosos de vários tamanhos são proeminentes.

O diagrama do padrão vascular com os respectivos diâmetros vasculares médios é mostrado na figura 7 e na figura 8 é apresentada a bolsa da bochecha do *hamster* *in natura* para observações microscópicas, fixada em uma base de silicone.

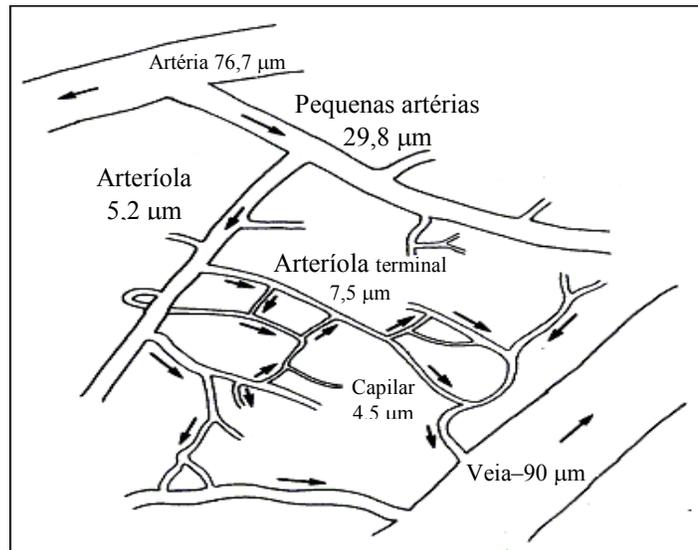


Figura 7. Padrão da microcirculação da Bolsa da bochecha do *hamster* com os respectivos diâmetros. Adaptado de Wiedeman, 1963.

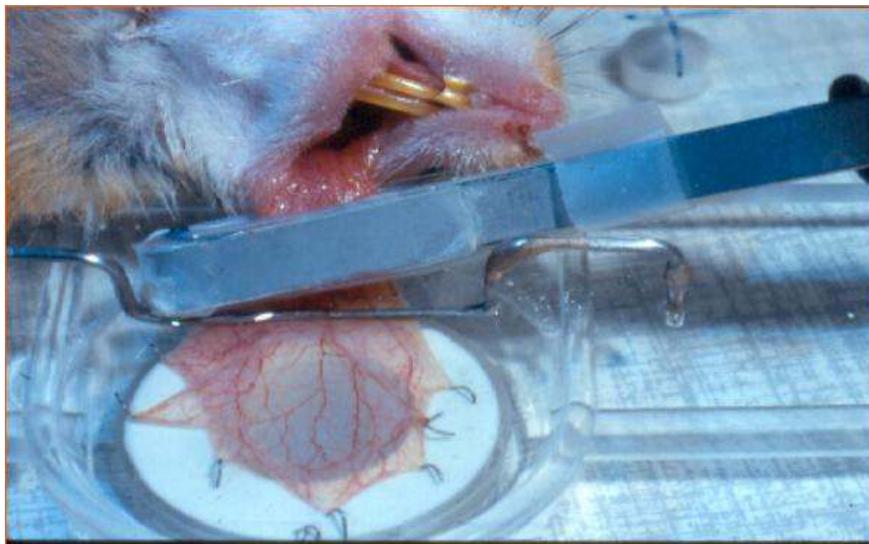


Figura 8. Microcirculação da bolsa da bochecha do *hamster* *in natura* para estudos microcirculatórios.

### **2.1.6 – Auto-Regulação**

O processo de controle local do fluxo de sangue está associado às necessidades metabólicas dos diferentes tecidos, e pode ser a longo ou curto prazo. No caso de longo prazo, se um tecido aumenta sua atividade metabólica por um espaço de tempo longo, o número de capilares aumenta. É o que acontece, por exemplo, com os tumores – é denominado auto-regulação em longo prazo. Quando o metabolismo de um tecido é aumentado por algumas horas, pode ocorrer vasodilatação ou vasoconstricção local, para regular o fluxo de sangue naquela região. Este processo é chamado auto-regulação em curto prazo (Wiedeman *et al*, 1981).

### **2.1.7 – Resistência ao Fluxo e Queda de Pressão ao Longo da Microcirculação**

O fluxo sanguíneo através de um vaso é determinado por dois fatores: (1) a diferença de pressão do sangue entre as duas extremidades do vaso (gradiente de pressão); (2) O impedimento ao fluxo sanguíneo, ao longo do vaso, que é chamado de resistência vascular (Guyton e Hall, 2002).

A curva da figura 9 mostra a distribuição de pressões sanguíneas na bolsa da bochecha de um hamster (Guyton e Hall, 2002). No sistema cardiovascular há uma queda na pressão média do sangue das artérias para as arteríolas, das arteríolas para os capilares e para as vênulas.

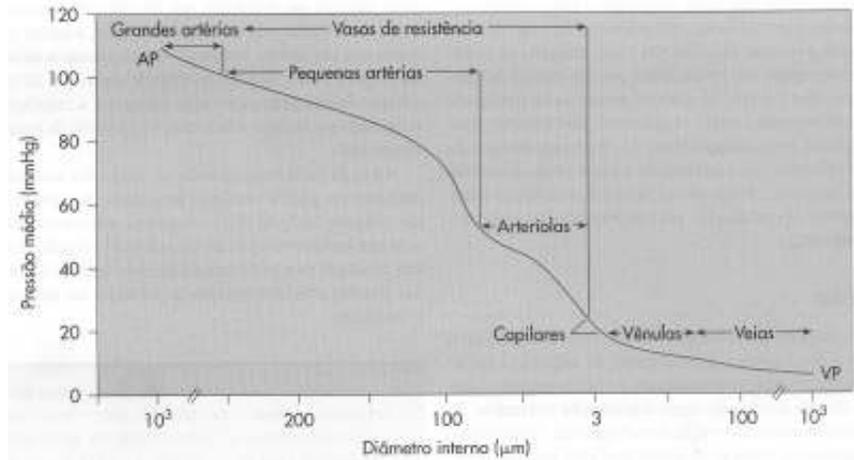


Figura 9. Variação da pressão sanguínea nos diferentes segmentos do sistema circulatório na bolsa na bochecha do *hamster*. Adaptado de Guyton e Hall, 2002.

Baseado na lei de Poiseuille, a resistência ( $R$ ) ao fluxo sanguíneo é dada pela equação 3.

$$R = \left( \frac{128}{\pi} \right) \left( \frac{\mu l}{D^4} \right) \quad (3)$$

Esta equação demonstra que o diâmetro de um vaso é o fator determinante da resistência ao fluxo sanguíneo (Lipowsky, 2005). De acordo com a literatura, 2/3 do total de resistência ao fluxo sanguíneo encontram-se nas arteríolas, pelo fato desses vasos controlarem o fluxo sanguíneo para os capilares (Guyton e Hall, 2002).

Baskurt, Yalcin e Meiselman (2004) reportaram que o diâmetro do vaso e o seu tamanho são os fatores determinantes da resistência ao fluxo. Slaaf, Tangelder e Reneman (1993) descreveram que em um dado momento no tempo, o diâmetro ao longo do comprimento do vaso pode variar devido a irregularidades na estrutura da sua parede e o diâmetro arteriolar varia com o tempo de forma

cíclica devido aos ciclos de vasomoção, fazendo com que a resistência ao fluxo sanguíneo seja dependente do tempo.

## **2.2 – Técnicas de Medidas de Fluxo na Microcirculação**

A medida de fluxo na microcirculação iniciou-se há mais de 300 anos, quando Antonie Van Leeuwenhoek observou o movimento de eritrócitos na rede arteriolar e capilar da cauda da enguia (Munro, 1966). Para fazer estas medidas, Van Leeuwenhoek utilizou um grão de areia como sua unidade de medida de distância e o tempo requerido para pronunciar uma palavra de quatro sílabas como sua unidade de tempo.

Este tópico faz uma descrição dos princípios básicos de operação das diversas metodologias disponíveis atualmente para medição de fluxo (especificamente velocidade) na microcirculação.

### **2.2.1 – Método de Varredura de Imagem**

Dos vários métodos usados para medir fluxo microvascular, o método de varredura de imagem é talvez o menos sujeito a erros por seguir o movimento das células individuais (Johnson, 1986). Entretanto seu uso ficou limitado para condições onde uma única célula podia ser seguida no campo visualizado ou identificada em janelas sucessivas ou em gravador de vídeo. A estimativa de velocidade da RBC foi obtida pela técnica de Mancha Voadora, na qual uma mancha móvel era projetada dentro do campo de visualização e ajustada para se mover com a mesma velocidade da RBC (Brånemark, 1963).

O método de localização de imagem foi também usado *off-line* em conjunto com uma câmara de alta velocidade (Bloch, 1962) ou gravadores de vídeo (Klitzman e Johnson, 1982) para obter a estimativa da velocidade da RBC. Este método foi largamente utilizado para determinar o perfil de velocidade em tubos de vidro (Bugliarello e Hayden, 1962) e em arteríolas e vênulas (Schmid-Schönenbein e Zweifach, 1975). Entretanto, este método apresenta uma limitação em virtude da alta qualidade requerida em relação às imagens das RBCs, que não podiam ser obtidas quando a concentração de hematócrito no vaso ou o tamanho do vaso era grande. Outra limitação da técnica é ser extremamente trabalhosa e requerer análises quadro-a-quadro, limitando a quantidade de dados que pode ser obtida.

### **2.2.2 – Técnica de Imagem de Raia**

Este método utiliza uma análise visual. Com este método a imagem do vaso microcirculatório é formada na ocular do microscópio ou no filme fotográfico e com a passagem das RBC's no campo de visualização do microscópio uma risca é produzida no filme (Munro, 1966). Um prisma girando interposto no caminho da luz produz imagens em ângulos apropriados na direção do fluxo. Como o prisma e a RBC se movem simultaneamente, uma raia é formada a qual é orientada no ângulo da direção do fluxo. Pela medida da taxa de movimento do prisma requerido para produzir uma raia de 45° da direção do fluxo, estima-se a velocidade da RBC. Esta técnica é usada para medidas *on-line* pelo observador ou a raia é gravada em filmes fotográficos para análise *off-line*. De acordo com dados reportados da literatura, o método apresentado oferece uma vantagem em

relação ao método de análise quadro-a-quadro, o qual requer uma identificação das imagens das células específicas, em virtude de ser menos tedioso.

### **2.2.3 – Método de Dupla Fenda**

Os métodos de imagem-raia e localização de imagem são laboriosos e provem informações descontínuas quando comparados com as técnicas fotométricas desenvolvidas mais recentemente. O método fotométrico comumente usado é o Método de Dupla Fenda (Wayland e Johnson, 1967). Na forma como é empregado, um tecido fino é transiluminado e a imagem é projetada na tela na qual é penetrada por duas fendas, atrás das quais são posicionados dois tubos fotomultiplicadores. De acordo com o sentido do fluxo, as RBCs passam primeiro por uma das fendas (*upstream*), gerando um sinal padrão característico pelo trem de RBCs. Este padrão é muito bem reproduzido nas proximidades da fenda seguinte (*downstream*). Comparando os dois padrões, pode-se determinar o atraso de tempo pela inspeção visual dos dois traços ou pela técnica de correlação.

### **2.2.4 – Método de Dupla Janela**

Um avanço adicional na tecnologia de medida de fluxo utiliza o princípio de duplo-sensor como aplicado nos sistemas de televisão. No método de dupla-janela (Intaglietta, Silverman e Tompkins, 1975), as amostras dos sinais de vídeo das duas áreas são sobrepostas à imagem do microvaso como aparece no monitor de televisão. Os sinais são então semelhantemente controlados pelos sinais gerados

pelos detetores óticos. Uma vantagem deste método é que ele possibilita ao pesquisador gravar o campo microcirculatório em vídeo e fazer uma análise posterior do campo para determinar a velocidade em vários vasos simultaneamente. A desvantagem da técnica é que a varredura da tela do sistema de vídeo, limita a máxima velocidade que pode ser medida em torno de 2 mm/s. A baixa velocidade medida por este método, limita a sua utilização para medidas de fluxo a nível capilar. Neste caso nenhum fator de correlação é necessário para relacionar a velocidade medida pelo sistema de dupla fenda com a velocidade da RBC. O erro da medida é presumivelmente inerente ao sistema de televisão, à relação sinal-ruído do sinal de televisão e ao correlator.

### **2.2.5 – Prisma de Grades e Matrizes**

Um método um pouco diferente para o problema de medida de fluxo envolve a análise de frequência dos sinais fotométricos. Na forma mais simples, este método consiste de um único sensor fotométrico atrás de uma grade na qual projeta-se a imagem do microvaso. Como as RBC's passam acima da grade, um sinal é gerado cuja frequência fundamental é proporcional a velocidade da célula. Para melhor confiança da estimativa da velocidade e magnificação do sistema, a constante da grade está relacionada com o diâmetro da célula (Nitta *et al*, 1983, e Jeurens *et al*, 1984). A frequência do sinal é dependente do espaçamento da grade e a velocidade da célula é dada de acordo com a equação  $f = VM/d$ , onde  $f$  é a medida da frequência,  $v$  a velocidade da célula,  $M$  a magnificação do sistema e  $d$  é a constante de grade ou distância entre as faces da grade. Conhecendo a

magnificação e o espaçamento da grade, é possível calcular a velocidade da RBC a partir da frequência fundamental. Este método foi implementado com um prisma de dois estágios (Kiesewetter *et al*, 1982) e a técnica de prisma de grade de três estágios desenvolvida por Slaaf *et al* (1981).

### **2.2.6 – Correlação Espacial**

Este método foi implementado de várias formas (Goodman *et al*, 1974; Anliker *et al*, 1977; Tymi e Sherebrim, 1980). O método desenvolvido por Anliker (1977) utiliza dois circuitos fechados de TV e dois gravadores de vídeo, os quais são controlados pelo computador do laboratório. As duas câmaras operam rapidamente e fora de fase, e provêm uma varredura substancialmente grande. Por este meio é possível procurar trens de RBC's, viajando em alta velocidade, e selecionar o intervalo de tempo entre as buscas das duas câmaras, que é substancialmente curto, e medir fluxos de alta velocidade.

O método de correlação espacial também foi usado por Tymi e Sherebrim (1980). Estes pesquisadores perfizeram uma busca vertical num vaso alinhado verticalmente com uma única câmara de televisão e gravaram a informação numa memória. Uma mesma busca na próxima janela também era posta na memória. Estas duas buscas, quando comparadas, revelaram o deslocamento do trem de RBCs. Esta informação pôde então ser correlacionada para obter a velocidade linear. A máxima velocidade a qual pode ser medida também ficou limitada pela frequência de varredura do sistema, porém este método conseguia medir velocidades maiores que o método de dupla fenda.

### 2.2.7 - Técnica de Correlação Cruzada

A habilidade de observar os microvasos e o movimento das células sangüíneas diretamente por meio de um microscópio permitiu o desenvolvimento de técnicas automáticas de avaliação de velocidade de fluxo. Estes métodos se baseiam na observação de que na circulação capilar as células vermelhas passam em uma fila simples, com um espaçamento irregular de plasma entre elas. Uma vez que estes padrões se mantêm constantes em distâncias curtas, eles podem ser empregados na determinação do tempo de transito em uma distância conhecida (Slaaf, Tangelder e Reneman, 1993). A análise destes padrões é usualmente efetuada empregando dois sensores ópticos posicionados em janelas no centro da imagem do vaso separado por uma distância conhecida ( $\Delta x_0$ ). A figura 10 esquematiza este método. A intensidade luminosa recebida pelos sensores ópticos é modulada pela passagem das células resultando em sinais semelhantes, porém apresentando um atraso no tempo inversamente proporcional a velocidade do fluxo sangüíneo. O tempo de transito das células entre os dois pontos onde estão posicionados os sensores ( $\Delta t$ ) é obtido por meio da estimativa do máximo valor apresentado pela correlação cruzada entre os sinais provenientes dos sensores ópticos (Intaglietta e Tompkins, 1971). A função de correlação cruzada de um histórico de tempo de dois sinais, admitindo ergodicidade (Papoulis, 1965), descreve a dependência dos valores de um sinal em relação ao outro. Desse modo, a função de correlação cruzada dos valores de  $x(t)$  no tempo  $(t)$  e  $y(t)$  no tempo  $(t + \tau)$ , ambas de comprimento  $T$ , pode ser estimada pelo

produto médio dos dois valores sobre o tempo de observação T. A correlação cruzada, neste caso, é descrita pela equação (4).

$$R_{xy}(\tau) = \frac{1}{T} \int_0^T x(t)y(t + \tau)dt \quad (4)$$

A velocidade (V) ao longo do vaso é estimada pela relação  $V = \Delta x_0 / \Delta t$ .

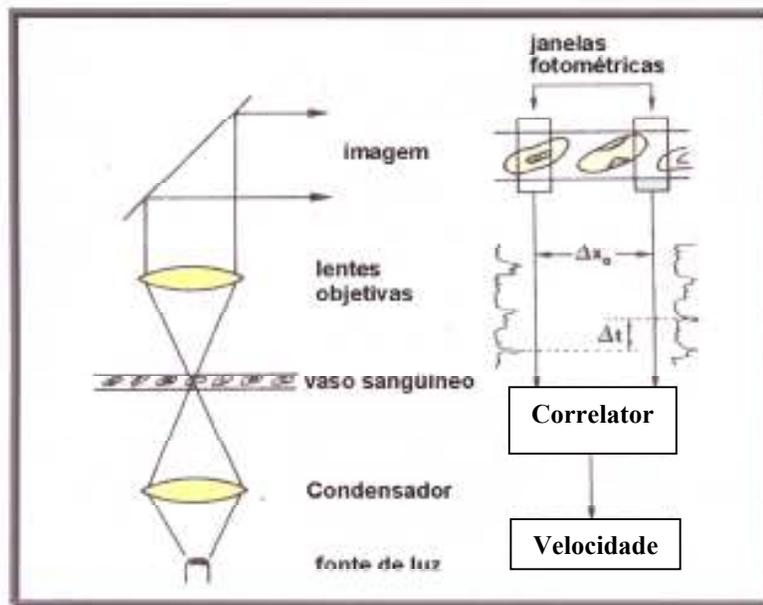


Figura 10. Representação esquemática da instrumentação empregada na estimativa de velocidade do sangue na microcirculação pelo método da correlação temporal. Adaptado de Slaaf *et al*, 1993.

Essencialmente, a função de correlação cruzada mede a similaridade existente entre dois sinais deslocados no tempo (Intaglietta, Monti, e Tompkins, 1974; Jordan, Bishop e Kiani, 1989; Beck e Plaskowski, 1987). A função de

correlação cruzada permite que a relação entre duas diferentes funções seja investigada (Jordan, Bishop e Kiani, 1989).

A vantagem em utilizar a função de correlação cruzada na estimativa do atraso de tempo entre dois sinais é que quaisquer sinais espúrios presentes na entrada, como interferência, são fortemente rejeitados porque eles não têm correlação com os sinais  $x(t)$  e  $y(t + \tau)$ . Como os sinais espúrios não são correlacionados a correlação cruzada deles tende a zero, considerando o tempo de integração suficientemente longo. A rejeição de sinais espúrios, como a interferência, é a mais importante vantagem da correlação cruzada (Beck e Plaskowski, 1987).

### **2.2.8 – Correlação de Dados Amostrados**

A equação da função de correlação cruzada empregada no domínio de tempo discreto, para perfazer os cálculos dos dados amostrados, está apresentada na equação 5 (Beck e Plaskowski, 1987).

$$R_{xy}(j\Delta t) = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N x_n y_{n+j} \quad (5)$$

Onde  $R_{xy}$  representa a correlação entre os sinais  $x$  e  $y$ ,  $N$  é o número de amostras,  $\Delta t$  é o intervalo de amostragem,  $j$  é o índice do atraso de tempo e  $j(\Delta t)$  é o atraso de tempo detectável.

### 2.3 - Técnicas de Sensoriamento

Existem várias técnicas de sensoriamento de medidores de fluxo utilizando a técnica de correlação cruzada. Estas técnicas podem ser divididas dentro de quatro categorias (Beck e Plaskowski, 1987):

- 1) Modulação de uma radiação externa por alguma propriedade do fluxo escoando;
- 2) Emissão de radiação por um fluxo escoando;
- 3) Medidas instantâneas de propriedades físicas do fluxo escoando, tais como: mudanças na capacitância; condutividade térmica ou elétrica; índice de reflexão;
- 4) Marcadores injetados no fluxo escoando.

A técnica utilizada no presente projeto para detecção da passagem das RBCs através da microcirculação foi a modulação da radiação externa. O princípio deste método envolve a detecção da alteração da radiação por alguma propriedade do fluido. Um feixe de radiação com intensidade máxima  $I_0$  é emitido pela fonte, incide sobre o fluxo num plano perpendicular ao eixo do tubo. Esta energia será espalhada e absorvida pelos constituintes do fluxo, chegando no sensor com intensidade  $I$  dada pela lei de Beer.

$$I = I_0 \exp(-ad) \quad (6)$$

onde  $d$  é o diâmetro do tubo e  $a$  é o coeficiente de atenuação total, expresso pela soma dos coeficientes de atenuação por espalhamento e de absorção. Para o sangue a absorção é devida à hemoglobina nas RBCs.

## **2.4– Coeficiente de Correlação**

O sangue é um complexo de glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas, suspenso numa solução (plasma) composto por sais, proteínas, carboidratos e lipídios (Berne *et al*, 2004). Esta grande concentração de componentes químicos, inviabiliza a utilização dos sinais gerados por estes componentes para habilitar e desabilitar um contador, por exemplo, para obter a medida direta do tempo de transito entre os detectores (Intaglietta e Tompkins, 1971).

Intaglietta e Tompkins (1971), reportaram que o movimento relativo das camadas das partículas e a turbulência geram ruídos, alterando, assim, a assinatura ótica dos sinais captados pelos fotodetectores. Assim, os sinais oriundos dos sensores, além de conter as informações decorrentes da passagem das RBCs, também contem ruídos de baixas frequências gerados pelos próprios sensores óticos.

Quedas do índice de modulação da luz fazem com que ruídos aleatórios gerados pelos fotodetectores decresçam a relação sinal-ruído fazendo com que a correlação diminua (Beck e Plaskowski, 1987).

Com o objetivo de se avaliar os efeitos dos fenômenos citados pode ser utilizado o coeficiente de correlação, que avalia a associação linear entre os dois sinais. Mawson e Shore (1998) consideraram valores de atraso de tempo válidos

para cálculos de velocidades somente se o coeficiente de correlação fosse maior que 0,4.

O coeficiente de correlação dado por Bendat e Piersol (1980), é descrito pela equação 7.

$$\rho_{xy}(\tau) = \frac{C_{xy}(\tau)}{((R_{xx}(0)R_{yy}(0))^{1/2}} \quad (7)$$

Onde  $C_{xy}(\tau)$  é a covariância cruzada de  $x(t)$  e  $y(t)$ , medida relacionada a variabilidade conjunta existente entre os sinais. A função de covariância cruzada é dada pela equação 8.

$$C_{xy}(\tau) = E((x(t) - m_x)(y(t) - m_y)) \quad (8)$$

Onde,  $m_x$  e  $m_y$  representam, respectivamente, os valores médios.  $R_{xx}(0)R_{yy}(0)$  representa a variância.  $\rho_{xy}(\tau)$  está no intervalo (-1,1). Quanto maior for o módulo de  $\rho_{xy}(\tau)$ , maior será a similaridade existente entre os sinais dos fotodetectores.

# Capítulo III

## Materiais e Métodos

### ***3.1 – Descrição do Equipamento de Medida de Fluxo***

A figura 11 apresenta o diagrama em blocos do sistema de medida de velocidade sangüínea na microcirculação.

O sistema de visualização de vasos microcirculatórios é apresentado na figura 12, e consiste de um circuito fechado de TV (CFTV), composto por uma câmara CCD (Samsung), um vídeo cassete (Sony modelo: SLV 40BR) e um monitor de TV 14" (Hitron Systems Inc, modelo: HVM 2212). O CFTV auxilia a posicionar adequadamente a janela óptica no centro do leito do vaso capilar, além de possibilitar a gravação do experimento. Goldsmith (1972, 1979 e 1968) demonstrou que a concentração de RBCs não é uniforme através do vaso sangüíneo e a maior concentração encontra-se na porção central do vaso devido ao perfil de velocidade parabólico da lei de Poiseuille. O sistema contendo as detetores óticos (I.P.M., INC) fica instalado entre o microscópio e a câmara CCD e seu princípio de funcionamento estão descritos no sub-ítem 2.2.7.

Os diagramas em blocos contidos dentro do retângulo tracejado correspondem ao instrumento desenvolvido nesta dissertação. Na figura 13 está apresentado o instrumento para medida da velocidade das RBCs.

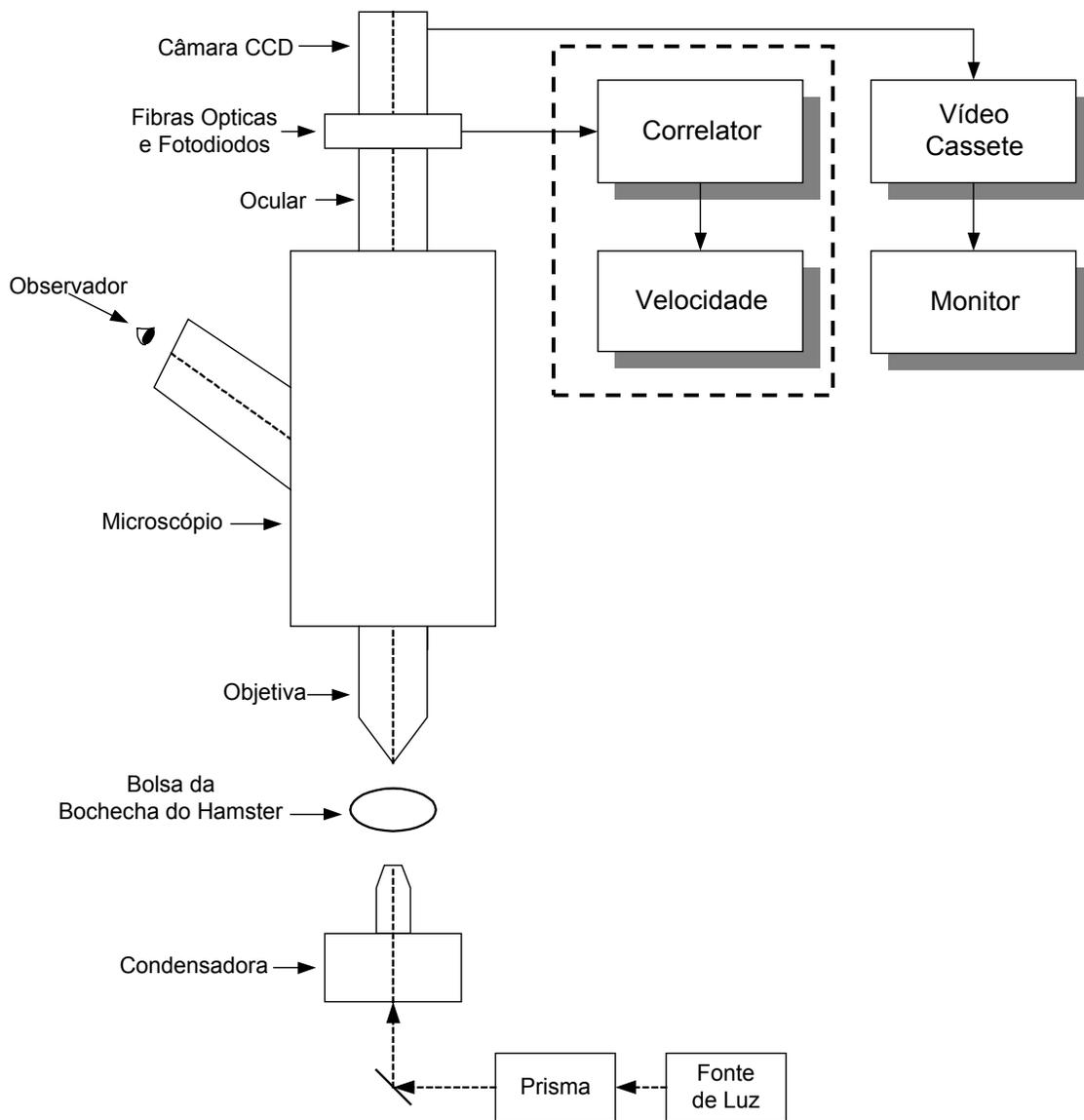


Figura 11. Diagrama em blocos do sistema de medida de velocidade na microcirculação.



Figura 12. Microscópio óptico para observação do fluxo de Células Sanguíneas Vermelhas (A), bomba de perfusão (B), manta aquecedora (C), Suporte dos sensores óticos (D), câmara de CCD (E), vídeo cassete (F) e monitor de vídeo (G).

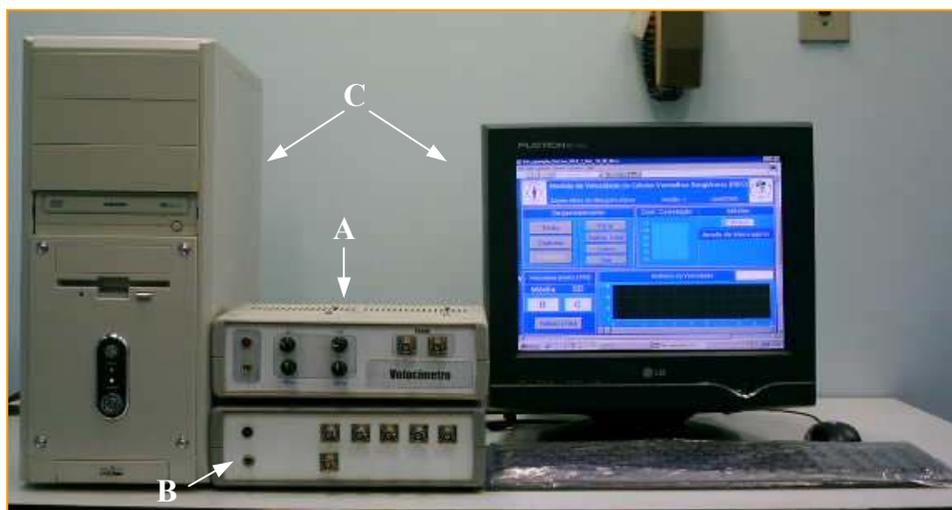


Figura 13. Instrumento de medida de velocidade das RBCs desenvolvido nesta dissertação. Unidade de processamento analógico (A), modelo elétrico (B) e computador utilizado para aquisição e processamento dos sinais (C).

A bolsa da bochecha do *hamster* é fixada numa base de silicone adaptada na base do microscópio. O tecido é então, transiluminado e observado com uma objetiva com aumento de 10x (figura 14).



Figura 14. Posicionamento da bolsa da bochecha do *hamster* na base de silicone ao microscópio.

## **3.2 – Implementação do Sistema**

### **3.2.1 – Parâmetros Básicos**

A determinação da resolução e da faixa do correlator foi baseada no trabalho de Stott (1987) e reportado por Beck e Plaskowski (1987). A determinação destes parâmetros é importante porque a acurácia necessária para que o correlator detecte pequenas mudanças no fluxo depende substancialmente

destes parâmetros. Para a determinação dos parâmetros do correlator foram considerados os dados do sistema medidor do fluxo, descritos a seguir.

### **3.2.1.1 – Espaçamento entre os sensores**

As fibras óticas são espaçadas paralelamente uma da outra por uma distância fixa da ordem do diâmetro de uma RBC, em torno de 10  $\mu\text{m}$ .

### **3.2.1.2 – Velocidades Mínima e Máxima**

Estas velocidades foram determinadas, baseadas nos estudos reportados por Hoening e Mohr (1968). Estes pesquisadores realizaram uma série de medidas da taxa média do fluxo de RBCs em diversos vasos da bolsa da bochecha do hamster, com diâmetros médios na faixa de 14-80  $\mu\text{m}$ . A faixa de velocidades das RBCs em arteríolas foi estimada entre 0,9-12,9 mm/s, enquanto nas vênulas, a faixa de velocidade foi estimada entre 0,4-6,6 mm/s. Nos capilares, a velocidade esta na faixa de 1 mm/s (Guyton e Hall, 2002). A faixa de velocidade foi definida, também com base na discussão e necessidade dos pesquisadores do LPM envolvidos em estudos microcirculatórios, como estando compreendida entre 0,2 – 50 mm/s.

### **3.2.1.3 – Erro no Pior Caso**

Foi definido um erro no pior caso na detecção da posição do pico ( $\tau_{\text{Max}}$ ). Com base nos trabalhos de Jordan, Bishop e Kiani, (1989); Beck e Plaskowski (1987), que consideram 2% um erro satisfatório para medidores que utilizam a

técnica de correlação cruzada. Levando-se em consideração o erro na detecção da posição do pico causado pelo erro de quantização do sinal que é igual a  $\pm\delta/2$ , onde  $\delta$  é o intervalo de amostragem, o erro de velocidade,  $dv$  (Jordan, Bishop e Kiani, 1989) é dado pela equação 9.

$$dv = \frac{1}{2} \left[ \frac{L}{n\delta - \frac{\delta}{2}} \quad \frac{L}{n\delta + \frac{\delta}{2}} \right] \quad (9)$$

como  $V = L/n\delta$ , é a velocidade indicada pelo correlator, o erro devido à quantização é dada pela expressão 10 (Jordan, Bishop e Kiani, 1989).

$$\frac{dv}{v} = \frac{1}{2n} \quad (10)$$

Onde  $n$  é a amostra referente à posição do pico. Observa-se que o erro na estimativa da velocidade aumenta à medida que  $n$  vai assumindo valores menores, um valor máximo ( $\pm 50\%$ ) ocorrerá quando  $n$  corresponder a 1 amostra (Beck e Plaskowski, 1987).

A partir do erro na detecção do pico (equação 10), foi determinado o número mínimo de pontos necessário para a função de correlação detectar o atraso no pior caso, o qual resultou em  $n_{min} = 25$  pontos.

### 3.2.1.4 – Resolução Temporal

Através da equação (11) (Beck e Plaskowski, 1987), a resolução temporal do sistema foi estimada a partir da relação entre o espaçamento entre os sensores, a máxima velocidade a ser medida, definida no sub-item 3.2.1.2, e do número mínimo de pontos definido no sub-item 3.2.1.3.

$$\delta = \frac{L}{V_{\max} n_{\min}} \quad (11)$$

Sendo  $L$  o espaçamento entre os sensores ( $\cong 0,01$  mm) e  $V_{\max}$  a máxima velocidade no sistema (50 mm/s). A resolução temporal resultou em  $\delta = 8 \mu\text{s}$ , o que corresponde a uma frequência de amostragem de  $f_r = 125$  kHz.

### 3.2.1.5 – Faixa do Instrumento

A Faixa do instrumento  $R_g$  está relacionada com as velocidades máximas e mínimas através da equação 12 (Beck e Plaskowski, 1987).

$$R_g = \frac{V_{\max}}{V_{\min}} \quad (12)$$

Substituindo os valores descritos no sub-ítem 3.3.1.2, obtemos  $R_g = 250$ . Pode-se então, determinar o número máximo  $n_{\max}$  de pontos necessários para a função de correlação ser avaliada. A faixa está relacionada com  $n_{\max}$  através de  $n_{\min}$  pela equação 13 (Jordan, Bishop e Kiani, 1989).

$$n_{\max} = R_g n_{\min} \quad (13)$$

Da equação 13, a função de correlação requer  $n_{\max} = 6250$  pontos para determinar o atraso máximo.

### 3.2.1.6 – Determinação dos Atrasos

Os atrasos de tempo mínimos e máximos ( $\tau$ ) do pico da função de correlação estão relacionados com as velocidades máximas e mínimas e o espaçamento entre os sensores, através da equação 14 (Beck e Plaskowski, 1987).

$$\tau = \frac{L}{V} \quad (14)$$

Obtem-se o atraso máximo,  $\tau_{\max} = 50$  ms e mínimo,  $\tau_{\min} = 200$   $\mu$ s.

A seguir são apresentados na tabela 1, os parâmetros do sistema e na tabela 2, os parâmetros calculados a partir da tabela 2.

Tabela 1. Parâmetros do sistema.

<b>Parâmetros</b>	
Espaçamento entre os sensores	0,01 mm
Erro no Pior Caso	2%
Velocidade Mínima	0,2 mm/s
Velocidade Máxima	50 mm/s

Tabela 2. Parâmetros derivados a partir da tabela 1.

Parâmetros	
Atraso Mínimo ( $\tau_{\text{Min}}$ )	200 $\mu\text{s}$
Atraso Máximo ( $\tau_{\text{Máx}}$ )	50 ms
Resolução Temporal	8 $\mu\text{s}$
Frequência de Amostragem	125 kHz
Faixa	250

### 3.3 – Diagrama em Blocos do Correlator

O diagrama dos subsistemas do correlator está apresentado na figura 15. A seguir as diversas etapas do correlator são descritas.

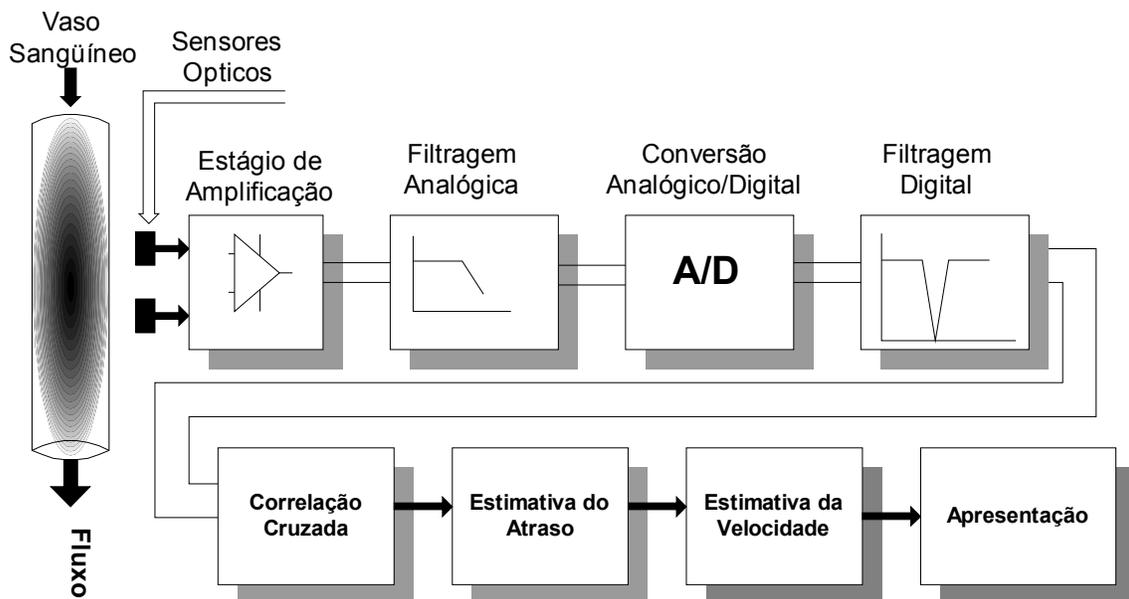


Figura 15. Diagrama descrevendo os subsistemas do correlator.

### 3.3.1 – Sistema Ótico

O conjunto ótico é acoplado ao microscópio e é constituído de fibras óticas que fazem a detecção pelo método de absorção. Foi desenvolvido pela I.P.M. Inc. San Diego, Califórnia (IPM, 1982) para o equipamento *Velocity Tracker*. O conjunto ótico é montado num suporte com um estágio de amplificação implementado com amplificadores de ultrabaixo ruído. A figura 16 mostra o sistema ótico.

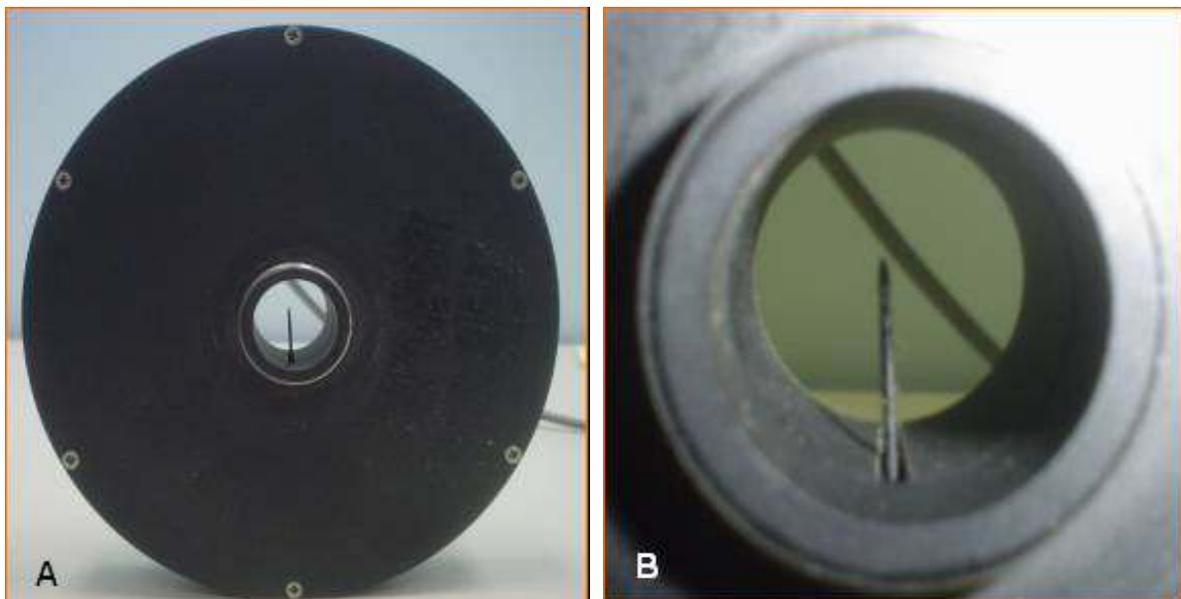


Figura 16: Conjunto ótico para detecção da passagem das RBCs (A) e detalhe das fibras óticas (B).

### 3.3.2 - Estágio de Amplificação

As saídas deste estágio são acopladas a um segundo estágio de amplificação montado na topologia de amplificador inversor. O objetivo desta amplificação é proporcionar um nível adequado aos sinais fotométricos para sua

digitalização e correlação. Este estágio foi implementado utilizando-se o CI LF 353 da *Texas Instruments*. A figura 17 apresenta o diagrama esquemático deste estágio. Este estágio possui um potenciômetro para correção dos efeitos da tensão de offset do 2º estágio de amplificação. O *offset* foi corrigido adicionando-se componentes externos conectados a um potenciômetro de 10k Ohms, cujo ajuste possibilita o cancelamento das assimetrias internas dos amplificadores operacionais, cancelando, desse modo, os efeitos da tensão de off-set ( $V_{IO}$ ). A tensão  $V_x$  aplicada no terminal não-inversor do amplificador foi encontrada através das contribuições superpostas de  $V_{cc}$  (+12V) e  $V_{ee}$  (-12V) usando o divisor de tensão dado pela equação 15.

$$V_x = \frac{[(1-x)R_1 + R_2]V_{cc}}{R_1 + R_2 + R_3} + \frac{(R_3 + xR_1)V_{ee}}{R_1 + R_2 + R_3} \quad (15)$$

Onde  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  são as resistências adicionadas para cancelamento do *offset*, e a saída do amplificador,  $V_{out}$ , é dada pela equação 16.

$$V_{out} = \frac{-R_5}{R_4}V_{in} + \frac{R_5 + R_4}{R_4}(V_{IO} + V_x) \quad (16)$$

Onde  $R_4$  e  $R_5$  são os resistores de ganho. Para corrigir os efeitos de  $V_{IO}$  na equação 18,  $V_x$  deve ser igual a  $-V_{IO}$ . Para que esta condição fosse alcançada, fez-se  $V_{ee} = -V_{cc}$  e  $R_2 = R_3$ . Desse modo, da equação 15, foi obtida a equação 17.

$$-V_{IO} = \frac{[(1-x)R_1 - xR_1]V_{cc}}{R_1 + R_2 + R_3} \quad (17)$$

Para que o resultado fosse alcançado, R1 foi ajustado na prática com os fotodetectores conectados no sistema. O objetivo dos resistores R2, R3, e o resistor variável R1 são de sobrepor uma pequena tensão dc sobre a saída do amplificador. Usando-se o resistor variável R1 esta tensão dc pode ser ajustada para eliminar  $V_{IO}$ .

O ganho de tensão foi ajustado experimentalmente para velocidade máxima proposta no projeto, utilizando-se a bomba de perfusão, onde chegou-se a  $A_V \cong 500$ .

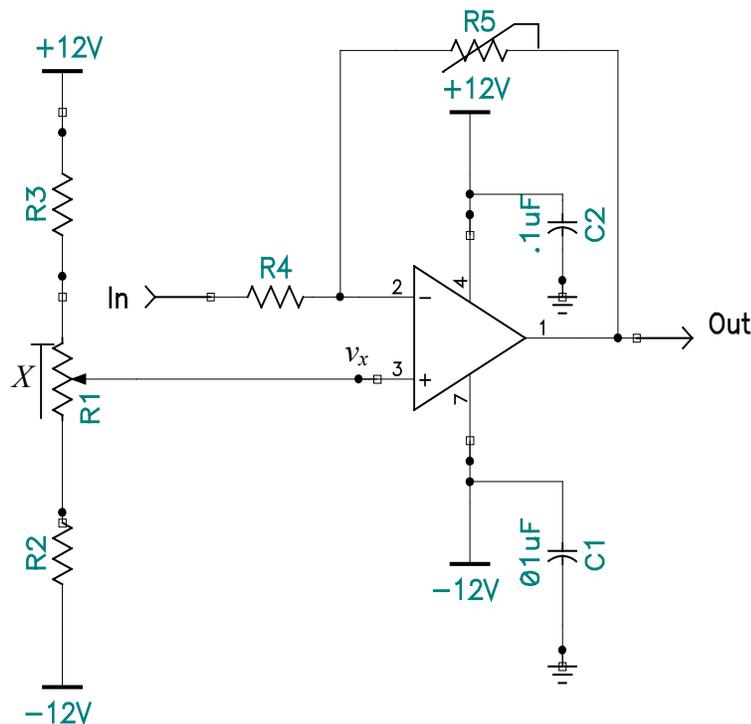


Figura 17, amplificador implementado na topologia amplificador inversor com ajuste de *offset* e seu objetivo foi para proporcionar uma segunda amplificação para os sinais oriundos dos fotodetectores.

### 3.3.3 – Interface A/D

A interface analógica/digital foi implementada utilizando-se uma placa de aquisição de dados da *National Instruments (Austin, TX-USA) NI\_DAQ PCI-6024E*. Esta placa possui 16 entradas analógicas, cuja tensão de entrada pode variar entre  $\pm 10V$ , um ADC de 12 Bits de resolução, 2 saídas analógicas (DAC) de 12 bits de resolução, com as saídas podendo variar entre  $\pm 10V$ , 2 contadores de 24 bits. A série E são placas multifunções de baixo custo e com as seguintes características e tecnologias: circuitos de proteção contra flutuações de temperaturas; tecnologia para melhorar a resolução; auto-calibração *Onboard*; possui um controle projetado para prover maior flexibilidade, baixa potência de consumo e alta imunidade a ruído e ao efeito *jitter*. Os ADCs são programados em linguagem de programação G em ambiente LabVIEW™, versão 5.1.1 (*National Instruments, Austin, TX*). Esta placa está conectada a um computador Pentium IV, 2,2GHz, HD 40GB, 256MB de RAM, CD ROM RW, entre outros periféricos utilizados para a implementação do Correlator. As principais características da placa de aquisição necessárias para implementação do correlator, estão descritas abaixo.

- Barramento ..... PCI
- Entradas Analógicas ..... 16
- Resolução ..... 12 Bits
- Taxa de amostragem máxima ..... 200 kHz
- Faixa de Tensão de Entrada.....  $\pm 10V$
- Banda Passante..... 500 kHz
- Impedância de Entrada..... 100  $\Omega$

### 3.3.4 – Filtro Passa-baixa anti-aliasing

O efeito da banda passante para estimativa de velocidade pela técnica de correlação cruzada é um parâmetro importante que influencia a acurácia do método. Quanto maior for a velocidade, maior serão as componentes espectrais gerados pelo fluxo, e o efeito da filtragem é freqüentemente o principal fator limitante da banda passante do sinal medido, em virtude da banda passante estar diretamente relacionada com a velocidade do fluxo (Beck e Plaskowski, 1987).

A banda passante mínima do filtro analógico foi estimada a partir do atraso mínimo do correlator. A banda passante ficou inversamente proporcional  $\tau_{\text{mín}}$ , correspondendo a uma freqüência de corte de 5 kHz. A equação 18 (Bendat e Piersol, 1980), descreve o erro médio quadrático normalizado ( $\epsilon^2$ ) da estimativa da correlação cruzada. Observa-se que  $\epsilon^2$  diminui à medida que o produto banda passante (B)–tempo (T) de aquisição aumenta. Para instrumentos que utilizam a técnica de correlação cruzada, o tempo de aquisição do sinal é um parâmetro importante, que pode afetar a capacidade do instrumento em acompanhar as variações dinâmicas do fluxo, em virtude do parâmetro ( $T$ ) estar relacionado com a velocidade do instrumento.

$$\epsilon^2 = \frac{1}{2BT} \left[ 1 + \frac{1}{\rho^2_{xy}} \right] \quad (18)$$

Onde o parâmetro  $\rho$  é o coeficiente de correlação cruzada.

Para assegurar que o instrumento tenha resposta dinâmica suficiente para medir as componentes de velocidade em função do tempo, a banda passante do filtro foi estendida para 10 kHz. Este filtro também atua como filtro *anti-aliasing*.

Neste projeto foi utilizado um filtro *butterworth*, por possuir uma resposta plana dentro da faixa de interesse. A função magnitude quadrática de filtros *butterworth* é dada pela equação 19.

$$|H(j\omega)|^2 = \frac{1}{1 + \left(\frac{\omega}{\omega_c}\right)^{2N}} \quad (19)$$

Onde  $N$  é a ordem do filtro,  $\omega_c$  é a frequência de corte e  $\omega$  é a frequência do sinal.

O gráfico do módulo da função de transferência tem a forma mostrada na figura 18. O gráfico apresenta dez curvas de respostas para implementação de filtros de 2 a 10 pólos para a faixa de frequências normalizadas entre 0,1 Hz a 10 Hz e frequência de corte normalizada em 1 Hz (-3dB). Onde se pode observar que acima de  $\omega_c$  o ganho do filtro diminui a medida que a frequência aumenta.

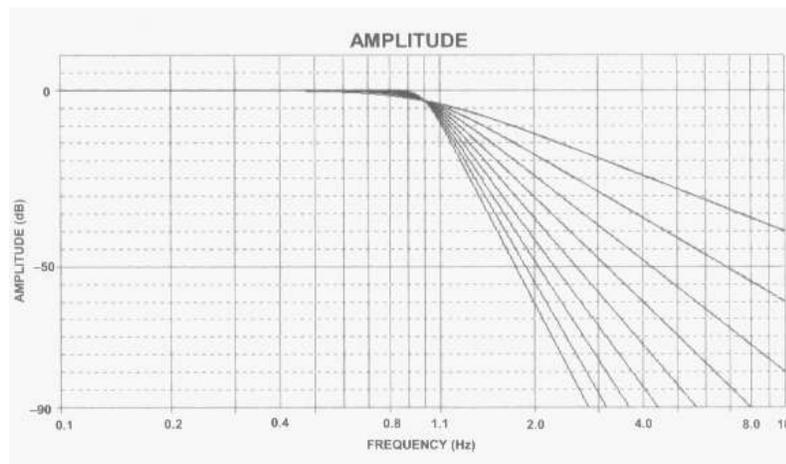


Figura 18. Função de transferência do filtro *Butterworth*. Adaptado da AD, 2002.

O projeto do filtro consistiu na determinação do parâmetro  $N$ , para as especificações abaixo:

- Frequência de corte: 10 kHz;
- Frequência de Amostragem: 125 kHz;
- Resolução do conversor 12 Bits;

O parâmetro  $N$ , assim como, os valores dos componentes passivos foram encontrados utilizando o programa *Filter Lab*, versão 2.0, resultando em  $N = 5$ . Um filtro de 5ª ordem foi então, utilizado. O filtro é composto por dois filtros de 2ª ordem e um de 1ª ordem ligados em cascata, ou seja, a saída do primeiro estágio é ligada na entrada do segundo estágio, conforme mostrado na figura 19.

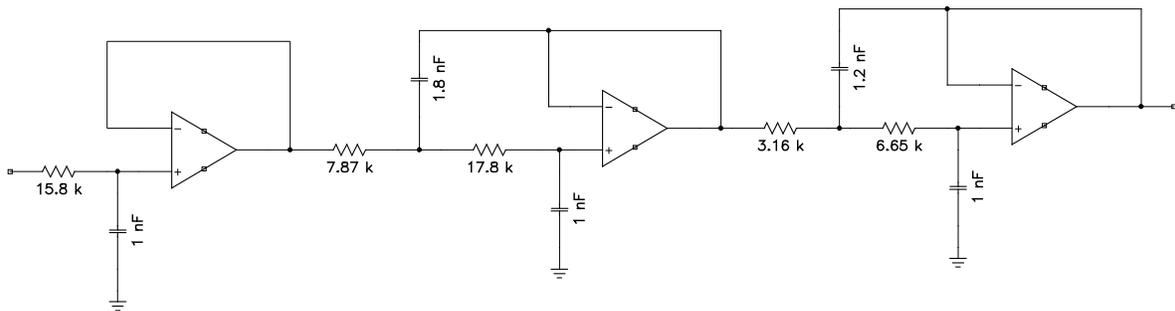


Figura 19 – Filtro ativo passa-baixa de 5ª ordem, *Butterworth*.

O filtro foi implementado utilizando-se dois amplificadores operacionais quádruplos TL084 da *Texas Instruments*, sendo um para cada canal.

Na implementação de filtros ativos, os componentes passivos representam um problema, por nem sempre estarem disponíveis comercialmente. Além deste, o elemento ativo possui um efeito pronunciado na resposta do filtro. Duas das limitações mais importantes do amplificador são a variação do ganho com a frequência e todos serem de banda limitada (AD, 2002). Consultando as folhas de dados do fabricante deste amplificador, verificou-se que o mesmo possui uma banda passante de ganho unitário de 3 MHz, o que atendeu as necessidades do projeto.

### **3.3.5 – Filtragem Digital**

O sistema de iluminação do microscópio é provido de uma lâmpada de filamento alimentada por uma fonte AC. Para analisar o efeito da iluminação do microscópio, o suporte contendo os fotodetectores foi montado no microscópio, sem experimento. A iluminação ambiente foi apagada e a lâmpada foi ajustada para o brilho máximo. Em seguida os sinais dos fotodetectores foram medidos durante 1 segundo, obtendo-se um total de 60 mil pontos. Após o sinal ter sido adquirido, foi feita a análise espectral utilizando o programa *Microcal Origin 6.0*. A partir desta análise pode-se determinar as frequências de interferência da lâmpada, tendo uma componente de maior amplitude em 120 Hz e duas menos intensas nas frequências de 60 e 240 Hz (figura 20).

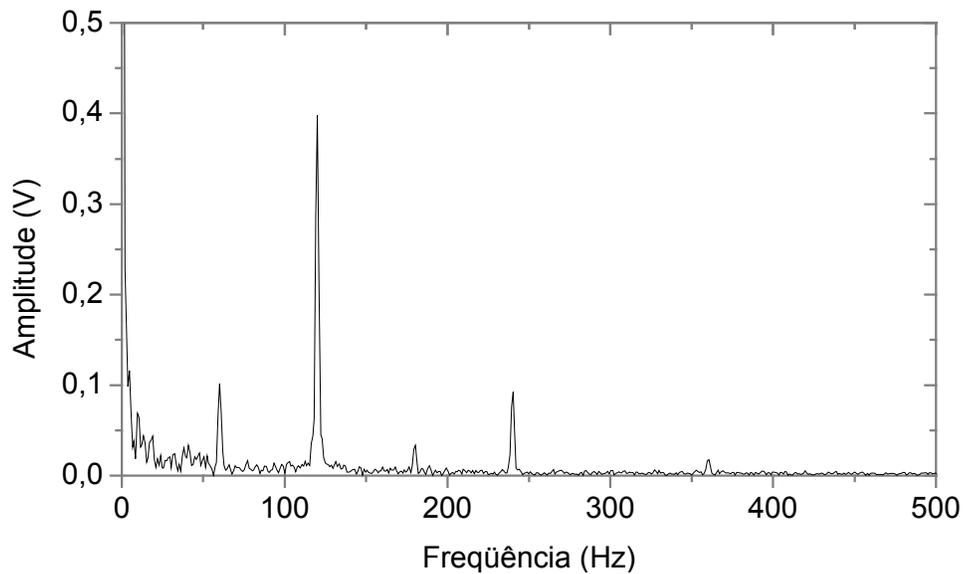


Figura 20. Efeito da iluminação do microscópio no sistema de medida de velocidade de RBCs.

Para eliminar as interferências de 60Hz, 120Hz e 240Hz foram implementados três filtros digitais rejeita faixa (*notch*), *Butterworth*, de 8ª ordem, um para cada canal de medida, de 60, 120 e 240 Hz, com uma atenuação em torno de 80 dB. Foram implementados filtros digitais por apresentarem resposta em frequência sem erros de fase (Higgins, 1990), por outro lado a filtragem analógica poderia introduzir erros na estimativa da correlação cruzada. O filtro rejeita faixa é especificado por uma frequência central,  $f_0$ , e por uma largura de banda  $\delta f$ , as frequências de corte inferior e superior foram especificadas considerando uma variação de  $\pm 1\%$  de  $f_0$ . Para a frequência de 60Hz, a frequência de corte inferior utilizada foi 59 Hz e a superior 61 Hz, o filtro de 120 Hz

utiliza as freqüências de corte de 119 e 121 Hz e o de 240 Hz 238 e 242 Hz. A figura 21 apresenta a análise espectral após as filtragens digitais.

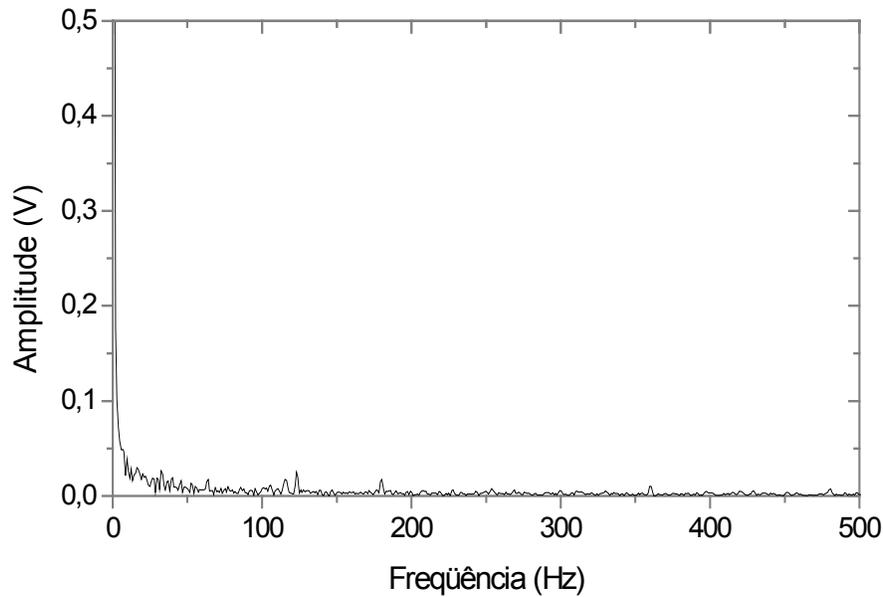


Figura 21. Sinais das interferências da lâmpada do microscópio após as filtragens digitais.

### **3.3.6 – Correlação Cruzada**

A estimativa da correlação foi obtida usando um VI da biblioteca do *LabVIEW*. Este VI perfaz o cálculo da correlação cruzada da forma apresentada na equação 5. Uma outra rotina é utilizada para estimar o índice onde ocorreu o máximo.

### **3.3.7 – Estimativa do atraso**

A diferença entre o índice da amostra correspondente ao máximo menos o número de amostras adquiridas dividido pela frequência de amostragem dá-nos o valor do atraso entre os sinais. O sinal positivo ou negativo define a direção do fluxo. O módulo da diferença corresponde então ao atraso temporal entre os sinais dos dois sensores.

### **3.3.8 – Estimativa da Velocidade**

A estimativa da velocidade é efetuada dividindo-se o espaçamento entre os dois sensores pelo atraso de tempo dada pela equação 3.

## **3.4 – Programa de Aquisição e Processamento**

O diagrama de blocos do programa de aquisição e processamento dos sinais é mostrado na figura 22. O programa possui uma tela principal, que corresponde ao painel frontal. Este painel foi desenvolvido de forma que apresentasse uma interface amigável para os pesquisadores envolvidos em estudos de fluxo microcirculatórios. Desse painel, todas as funcionalidades do programa podem ser acessadas (figura 23).

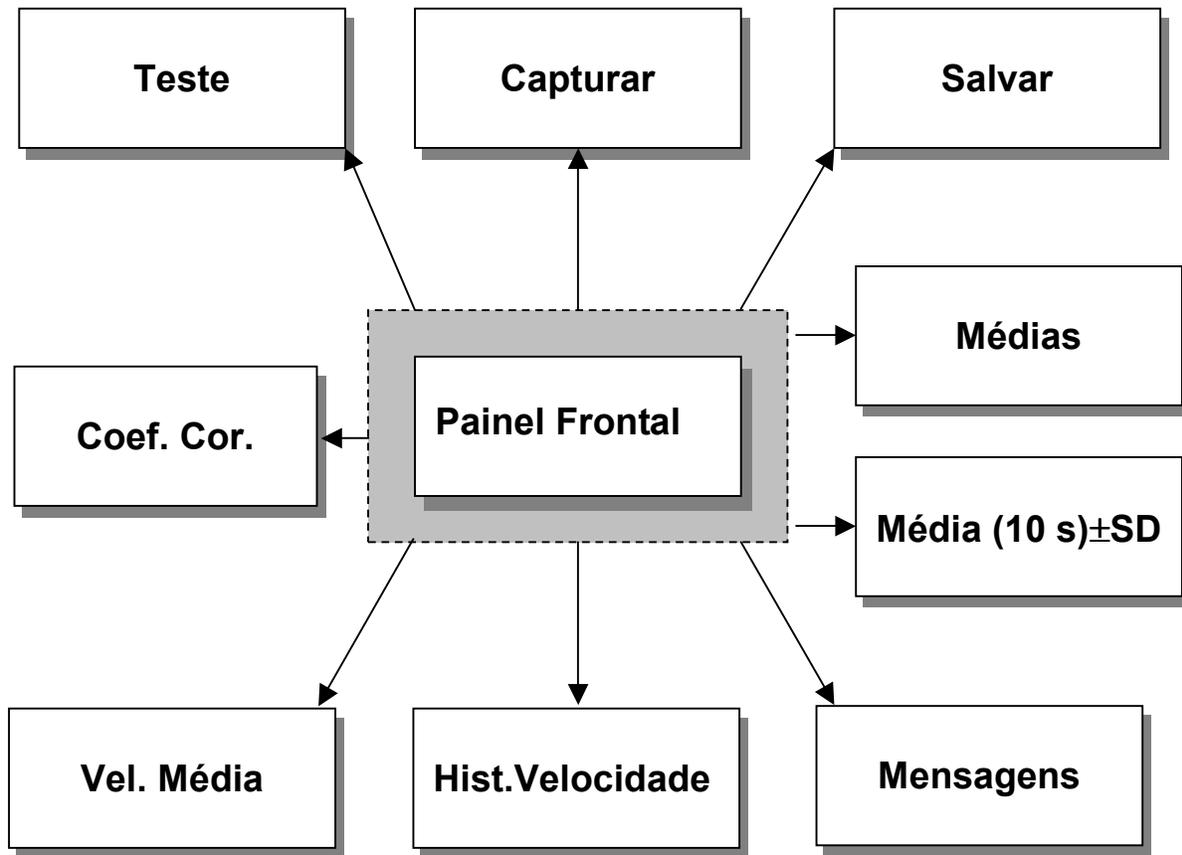


Figura 22. Diagrama em blocos do programa de aquisição e processamento.



Figura 23. Vista do painel frontal do programa de aquisição e processamento dos sinais microcirculatórios.

As rotinas do programa são executadas seqüencialmente, onde no primeiro passo, são executadas as inicializações das variáveis locais, globais, indicadores e gráficos. O programa possui uma rotina de teste, que permite a visualização dos sinais em forma de gráfico e do coeficiente de correlação de uma outra janela, antes que sejam processados (Figura 24). Desse modo, o pesquisador pode fazer os ajustes de ganhos para faixa de 2 volts e offsets através dos controles disponíveis no painel frontal da unidade de processamento analógico.



Figura 24. Painel frontal do programa de visualização dos sinais microcirculatórios.

A etapa *Capturar* (figura 23) corresponde à aquisição dos sinais para estimativas de velocidades. Esta estrutura corresponde a um controle *Booleano* que está ligado a uma estrutura de repetição *while*, enquanto o controle estiver no estado verdadeiro, todas as rotinas são executadas seqüencialmente. Os sinais são adquiridos e armazenados em dois vetores de tamanhos  $1 \times N_{Max}$ , sendo então submetidos a filtragem digital. Após a etapa de filtragem, os mesmos são tratados por uma rotina que estima o coeficiente de correlação, descrito no sub-ítem 2.4. O coeficiente de correlação estimado é visualizado em um gráfico, com mesmo nome, em forma de barra no painel frontal. O gráfico é atualizado a cada nova aquisição. Se o coeficiente de correlação for maior 0,4 (Mawson e Shore, 1998),

os sinais são considerados como válidos para estimativa de velocidade e a barra do gráfico fica branca. Se o coeficiente de correlação é menor que 0,4 a barra fica vermelha e os sinais são desprezados. Após a estimativa do coeficiente de correlação, os sinais passam pela rotina de correlação cruzada. A rotina seguinte determina o pico onde ocorreu o máximo, em seguida, uma rotina verifica se a amostra referente ao pico está dentro dos valores de  $n_{min}$  e  $n_{max}$  descritos nos sub-ítem 3.2.1.3 e 3.2.1.5. Se a condição foi satisfeita, a velocidade é calculada, sendo apresentada em um indicador numericamente e no gráfico denominado histórico da velocidade. Caso contrário, a amostra é rejeitada e uma mensagem *atraso fora da faixa de medida do aparelho* surge no painel frontal.

Na estimativa da velocidade, uma rotina de médias foi implementada com o objetivo de minimizar as flutuações temporais da velocidade em virtude do fluxo sanguíneo variar de acordo com a equação 2. Conforme descrito no sub-ítem 2.1.4.1, tanto o diâmetro quanto o fluxo do vaso variam continuamente, e conseqüentemente a velocidade. A rotina de médias foi implementada para que o instrumento apresentasse na saída uma velocidade média com os efeitos inerentes do próprio sistema biológico minimizados. Neste projeto, o pesquisador possui a opção de escolher: não fazer a média e fazê-la com 2, 4 e 8 amostras. De acordo com a média selecionada, um vetor do tamanho do número de médias é criado, sendo atualizado cada vez que uma nova velocidade é estimada. A saída do vetor é igual ao valor da nova velocidade estimada presente na sua entrada, mais as velocidades passadas. O resultado da média é apresentado em um indicador e um gráfico apresenta o histórico das velocidades estimadas durante o

experimento. O programa também possui uma rotina que perfaz a média  $\pm$  Desvio Padrão a cada dez segundos. Nesta rotina são armazenadas 10 amostras em um vetor e a cada dez segundos os resultados da média são apresentados. Esta rotina foi implementada com o objetivo de apresentar uma leitura de velocidade mais estável, minimizando os efeitos da variabilidade inerente ao sistema biológico.

Os dados de histórico das velocidades podem ser salvos no final do experimento (figura 23), no formato *ASCII*.

O painel frontal apresenta ainda um controle de limpar que zera os indicadores e apaga o gráfico do coeficiente de correlação e o gráfico do histórico da velocidade; e um controle *Parar* que interrompe a execução do programa.

### **3.5 – Testes em Modelos Elétricos**

Hoening e Mohr (1968) estudaram eletrocardiogramas de hamsters e reportaram que a taxa média de batimentos cardíacos nestes animais são maiores que a dos humanos, ficando na faixa entre 350-500 batimentos por minuto com variação de  $\pm 6\%$ , que corresponde a uma frequência cardíaca entre 5,8-8,3Hz. Baseado neste trabalho, foi implementado um gerador de onda quadrada estável, baseado em cristal, utilizando-se filtragem passa-baixas na frequência de 5Hz, conforme pode ser visualizado no diagrama em blocos da figura 25. Os correspondentes atrasos foram implementados dentro da faixa de  $\tau_{Min}$  e  $\tau_{Max}$  descritos nos sub-itens 3.2.1.3 e 3.2.1.5.

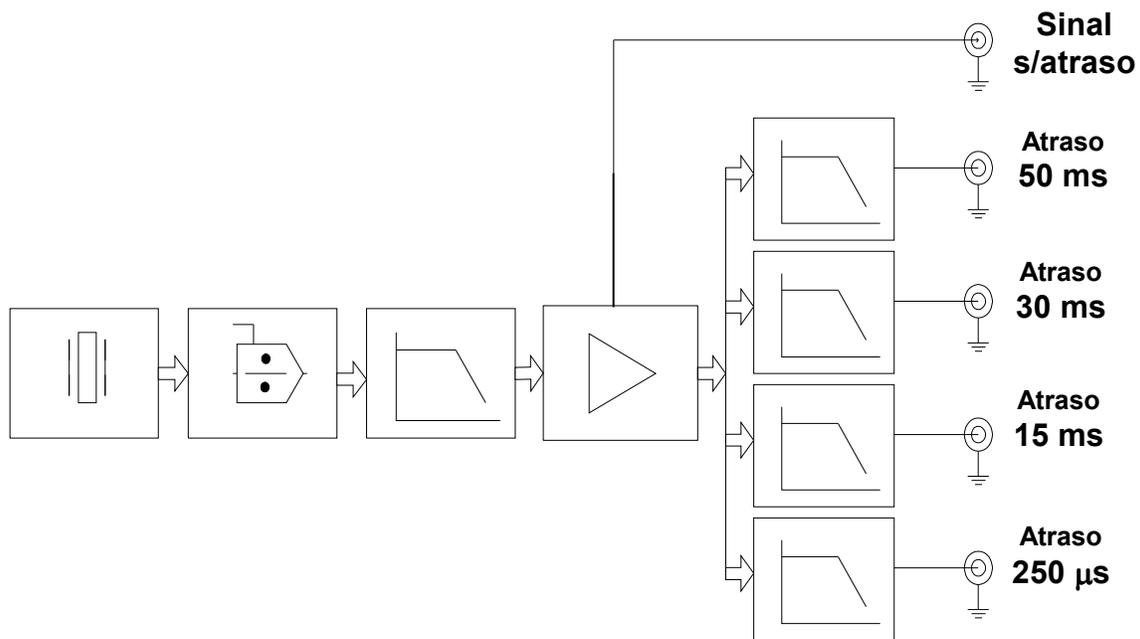


Figura 25. Diagram em blocos das linhas de retardo.

A figura 26 apresenta o diagrama esquemático do filtro passa-baixas. Os filtros foram montados em torno do circuito integrado TL084 (*Texas Instruments*).

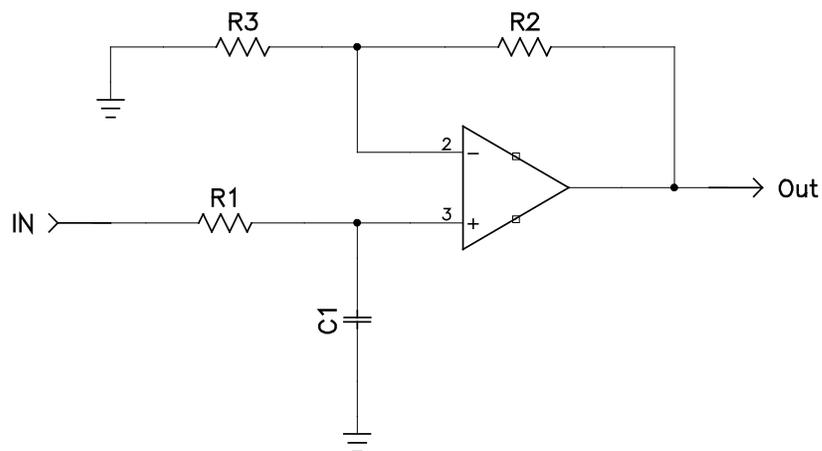


Figura 26. Diagrama esquemático do filtro passa-baixas.

O sinal para o amplificador operacional é derivado dos elementos passivos  $R_1C_1$ . A frequência de corte do filtro foi determinada a partir da equação 20 (AD,2002).

$$\Phi(\omega) = -\arctg \left( \frac{\omega}{\omega_0} \right) \quad (20)$$

Onde  $\omega$  é a frequência do sinal e  $\omega_0$  é a frequência de corte do filtro. A partir dos atrasos desejados, determinaram-se as frequências de corte dos filtros e os respectivos valores de  $R_1C_1$ , através da relação:  $f_0 = 1 / 2\pi R_1C_1$ .

Os resistores  $R_2$  e  $R_3$  são responsáveis pela amplificação do sinal filtrado. O amplificador está montado na configuração não-inversor. O ganho do amplificador na banda passante é dado pela relação:  $A_v = 1 + R_2 / R_3$ , onde  $A_v$  é o ganho máximo do circuito na banda passante, isto é:  $\omega < \omega_0$ . As calibrações das linhas foram feitas utilizando um osciloscópio digital *Tektronics*, modelo TDS220.

### **3.6 – Teste da resposta do correlator ao degrau**

As constantes de tempo do correlator em função das diferentes médias utilizadas foram avaliadas usando-se o modelo elétrico com atraso igual a 250  $\mu$ s. As constantes de tempo foram avaliadas impondo um degrau de atraso entre 0 e 250  $\mu$ s. Inicialmente, o modelo elétrico permaneceu desligado e o programa de aquisição e processamento dos dados foi posto em execução, indicando uma velocidade igual a zero. Após o tempo de aquisição em torno de 3s, o modelo elétrico foi ligado, impondo um degrau em torno da máxima velocidade a ser

medida pelo instrumento. O intervalo de média correspondeu ao tamanho da janela (0,5 s). Cada intervalo de média ( $T_{med}$ ) é dado pelo produto:  $T_{med} = NT_s$ , onde N é o número de amostras e  $T_s$  é o intervalo de amostragem. A cada intervalo de média um somatório das velocidades dá a média final.

### 3.7 – Calibração do Instrumento

A calibração do instrumento foi efetuada empregando uma seringa de 10 ml, um cateter para pequenos animais com 0,5 mm de diâmetro e uma bomba de perfusão (modelo 55-2222, Harvard Apparatus) (figura 27).



Figura 27. Descrição do aparato utilizado para calibração do instrumento.

Nesta etapa foram encontradas potenciais dificuldades para conseguir uma substância que pudesse simular o sangue. Diversos testes foram feitos com diferentes tipos óleos e substâncias (polímeros, lactose) que tivessem o diâmetro da ordem das hemácias. Foi utilizado pó de grafite para simular as hemácias. O pó foi suspenso em óleo de silicone que se caracteriza por ser um óleo fluído e possuir baixa viscosidade. A bomba foi ajustada para fluxos na faixa de  $\mu\text{l}/\text{min}$ , para que as velocidades ficassem dentro da faixa microcirculatória de interesse. O fluxo foi variado na faixa de 5 a 500  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Aplicando-se o princípio de conservação da massa (Cokelet, Pries e Kiani,1998), as velocidades lineares resultantes foram calculadas na faixa de 0,4–42 mm/s, valores dentro da faixa de velocidades típicas da microcirculação.

### **3.8 – Resposta do Instrumento ao Degrau de Velocidade**

O desempenho dinâmico do instrumento foi avaliado utilizando um motor com uma caixa de redução, conectado a uma fonte de alimentação variável de 0-30 V (Dawer, Modelo: DC Power Supply PS3002 D) e a tensão de saída da fonte foi ajustada para aproximadamente 4,5 Volts. Foi utilizando um *timer* e o tempo de uma revolução do disco foi medido para que a velocidade linear resultante ficasse em torno da velocidade máxima a ser medida pelo instrumento (50 mm/s). No eixo do motor foi adaptada uma engrenagem conjugada com outra engrenagem fixada em um outro eixo, para reduzir a velocidade para valores dentro da faixa de velocidade do fluxo microcirculatório. No eixo da engrenagem de maior diâmetro foi adaptado um disco de acrílico transparente com diâmetro de 300 mm, na sua

borda foi espalhado uma fina camada de sangue de *hamster* como fonte de sinal para simular o sangue fluindo no vaso sanguíneo. O sistema foi adaptado ao microscópio, sendo visualizado no CFTV utilizando uma objetiva com magnificação de 10x. Medidas de velocidade, utilizando um modelo semelhante, foram realizadas por Fleming, Klitzman e Johnson (1985) e Mawson e Shore (1998). A figura 28 apresenta o conjunto utilizado.



Figura 28. Figura do aparato utilizado para avaliar a performance dinâmica do instrumento.

### **3.9 – Preparação do Animal**

Todos os procedimentos com os animais estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela comissão de ética

para o cuidado e uso de animais experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA).

Nesta fase foram avaliados 3 *hamsters* normais, com massa corporal em torno de 130 g. A bolsa da bochecha do hamster é cuidadosamente evertida com o auxílio de um cotonete umedecido e sua parte distal, não muscular, identificada e presa a um anel de silicone. Esta preparação é feita com o auxílio de uma lupa (estereomicroscópio Leica, modelo M651, Wetzlar, FRG). Uma incisão é feita na camada superior que é presa lateralmente e o tecido areolar removido para expor a microcirculação da parte inferior para observações ao microscópio. Durante a preparação e a experiência subsequente, a bolsa da bochecha é continuamente superfundida, com uma velocidade de 4,6 ml/min, com uma solução salina tamponada por bicarbonato e *HEPES RING* pH 7,2, para evitar o ressecamento, manter a temperatura na faixa de 37° da bolsa da bochecha e evitar que o oxigênio oxide a preparação.

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Sanofi, 60 mg/ml) com uma injeção intraperitoneal e mantidos anestesiados com  $\alpha$ -cloralose (Merck, Darmstadt, Germany, 100 mg/kg) através de cateter inserido na veia femoral. Durante a preparação e o experimento, os animais tiveram à temperatura corporal mantida em 36,5°C com manta aquecedora controlada por termistor intrarretal (Araújo *et al*, 2002). A bolsa da bochecha foi preparada conforme técnica de Duling (1973) e adaptada por Svensjö (1978) e depois foi transferida para o microscópio. Um tubo de polietileno (PE 190) foi inserido na traquéia para facilitar a respiração espontânea (Figura 29). Foram efetuadas 10 medidas de velocidades

para cada tipo de vasos estudados. As medidas de velocidades em artérias, arteríolas, vênulas e veias, foram feitas empregando-se uma objetiva de 10x, enquanto nos capilares empregou-se uma objetiva de 20x.

Após os experimentos, os animais foram sacrificados aplicando-se uma injeção endovenosa de cloreto de potássio 3M.



Figura 29. Preparação da bolsa da bochecha para observação microscópica.

# Capítulo IV

## Resultados e Discussão

### ***4.1 – Teste em modelo elétrico para avaliação dos erros no sub-sistema de correlação.***

Os resultados da avaliação em modelo elétrico são apresentados na tabela 3. O correlator apresentou erros menores que 1% considerados adequados para a aplicação desejada.

Tabela 3 – Resultados da avaliação no modelo elétrico.

Atrasos	Correlator (s)	Erro (%)
250 $\mu$ s	0,000248	0,8
15 ms	0,015012	0,1
30 ms	0,030038	0,1
49 ms	0,048775	0,5

### ***4.2 – Resultado da Calibração in Vitro***

A figura 30 mostra as velocidades estimadas pelo instrumento em comparação com as velocidades de referência. Uma relação linear positiva entre as velocidades do correlator e as velocidades de referência foi obtida. O coeficiente de correlação do ajuste resultou muito próximo de 1 ( $r = 0,99$ ,  $p <$

0,0001) e o coeficiente angular foi igual a 1. Nesta figura pode-se observar uma relação linear em velocidades acima de 2mm/s.

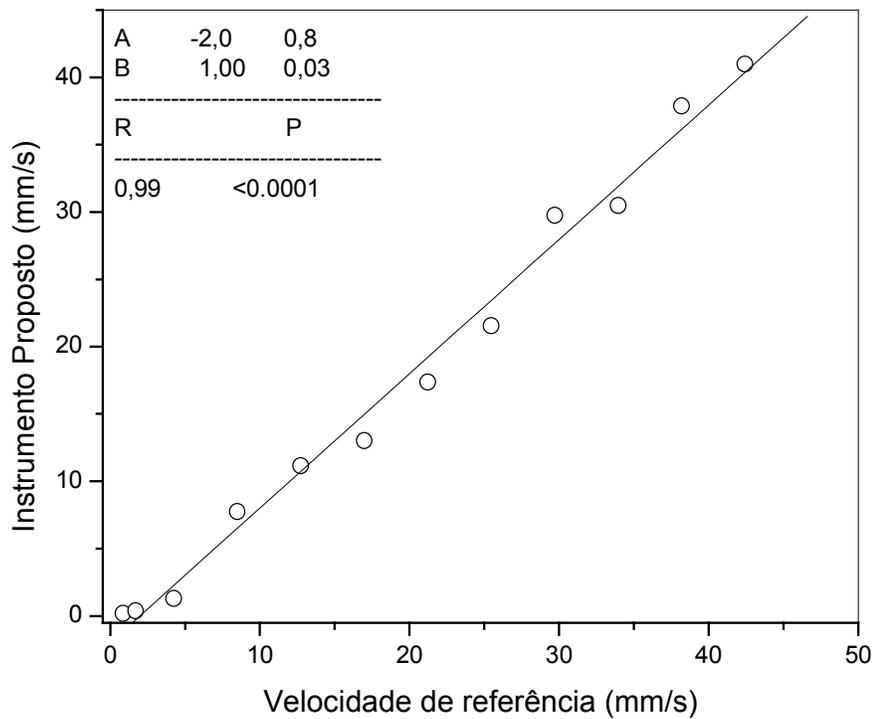


Figura 30. Curva de calibração do instrumento.

Os pequenos erros observados foram corrigidos por meio de uma rotina de calibração baseada na equação apresentada na figura 30.

### 4.3 - Resposta do correlator ao degrau

As velocidades em função do tempo para diferentes constantes de tempo são mostradas na figura 31 (A) sem média, onde a constante de tempo foi igual a

$\tau = 0,315$  s, (B) para amostragens de duas médias,  $\tau = 0,63$  s, (C) para quatro médias,  $\tau = 1,26$  s e (D) para oito médias  $\tau = 2,52$  s.

O número de amostragem na média é um parâmetro importante, pois afeta a velocidade de medida do instrumento. Os resultados obtidos na figura 31 são importantes mostrando a velocidade com que o instrumento irá acompanhar as variações do fluxo sanguíneo na microcirculação através do tempo. Assim, as constantes de tempo, para cada tipo de média, descritos nesta figura auxiliarão os profissionais biomédicos a ajustar o instrumento de acordo com o tipo de experimento a ser realizado. Para experimentos mais rápidos, como isquemia reperfusão, o pesquisador poderá utilizar a rotina sem médias (figura 31-A). Experimentos mais lentos, como testes de medicamentos, onde o efeito do medicamento leva um período de tempo maior até fazer efeito, o pesquisador poderá utilizar a rotina de 4 ou 8 médias (figuras 31-C e D).

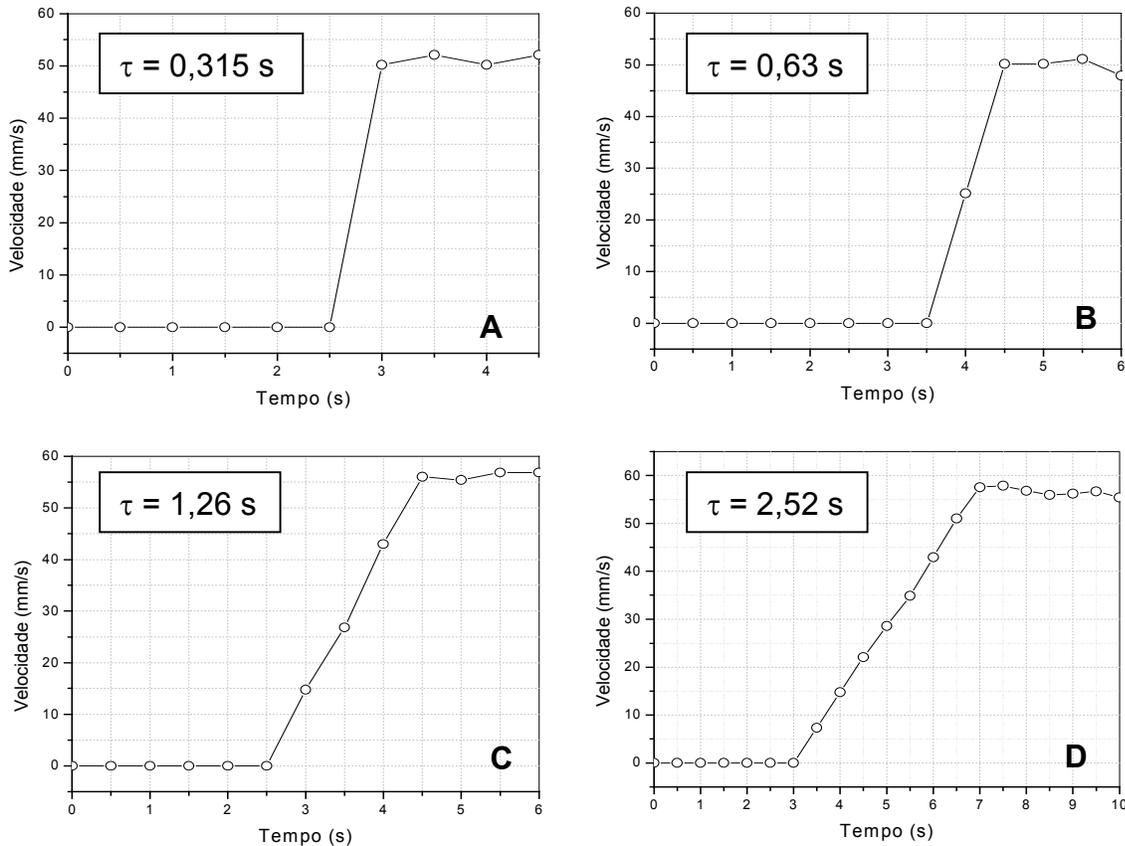


Figura 31. Respostas ao degrau utilizando modelo elétrico. Sem média (A), duas médias (B), quatro médias (C) e oito médias (D).

#### 4.4 – Resposta do Instrumento ao Degrau

A figura 32 apresenta a resposta ao degrau da medida de velocidade utilizando o disco com sangue espalhado. Para realizar este teste, foi utilizada a rotina de quatro médias. Este teste foi realizado com todo sistema de medida de velocidade ligado: microscópio, janelas ópticas, cabos e o sistema de processamento analógico. Conforme esperado, a constante de tempo para que o instrumento atingisse a velocidade máxima é semelhante àquela utilizando o modelo elétrico, para o mesmo número de médias (figura 31-c).

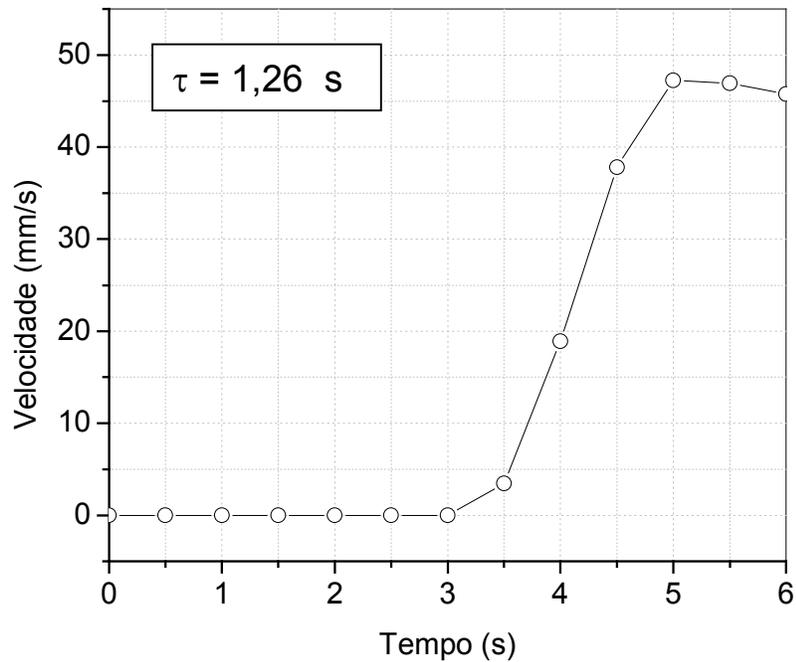


Figura 32. Resposta do instrumento ao degrau.

#### 4.5– Padrões dos Sinais Microcirculatórios

A figura 33 apresenta os padrões dos sinais microcirculatórios adquiridos no tempo, gerados com a passagem das RBCs, de três diferentes tipos de vasos da rede microvascular (capilar, arteríola e vênula). Observa-se que os sinais dos vasos microcirculatórios possuem padrões próprios. Sinais semelhantes nestes vasos foram reportados por Wayland e Johnson (1967); Golster *et al* (1999) usando imagem de laser doppler de alta resolução, em arteríolas da bolsa da bochecha do *hamster*.

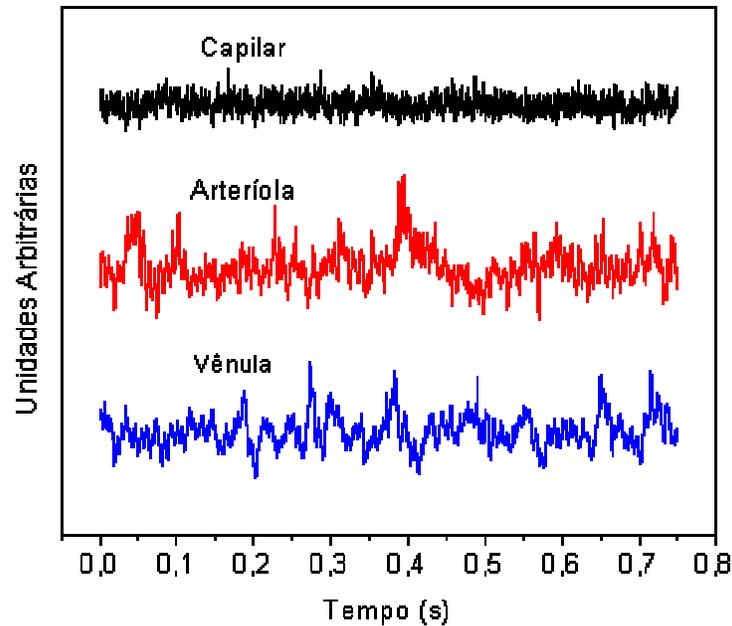


Figura 33. Sinais no domínio do tempo nos vasos microcirculatórios.

#### 4.6 – Testes “*in vivo*”

As velocidades foram comparadas utilizando o programa Statistica, versão 5.0. Para comparação entre os vasos foi utilizado o teste t não pareado, sendo considerados significativos valores de  $p \leq 0,05$ .

A figura 34 mostra o painel frontal do instrumento adquirindo e processando sinais de uma arteriola em tempo real. O gráfico mostra o histórico da velocidade plotado a cada quatro médias e ao lado, os indicadores mostrando a média  $\pm$  desvio-padrão a cada dez segundos.

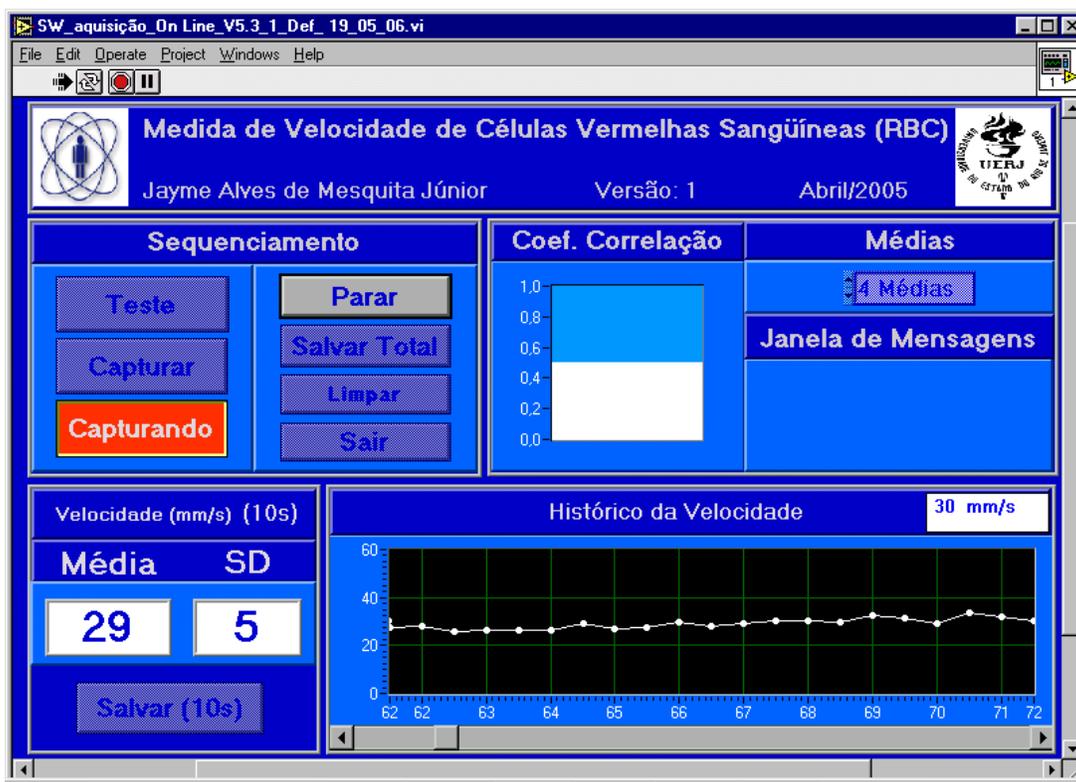


Figura 34. Painel frontal do instrumento mostrando um processamento em tempo real em uma artéria.

A figura 35 apresenta as velocidades nos diferentes tipos de vasos estudados. A ordem de apresentação dos resultados segue a seqüência fisiológica dos vasos (artérias, arteríolas, capilares, vênulas e veias), conforme descrito na figura 7 (página 20) e na figura 36. Em boa concordância com os princípios fisiológicos envolvidos, foram encontradas diferenças significativas nas velocidades entre os diferentes tipos de vasos ( $p < 0,002$ ).

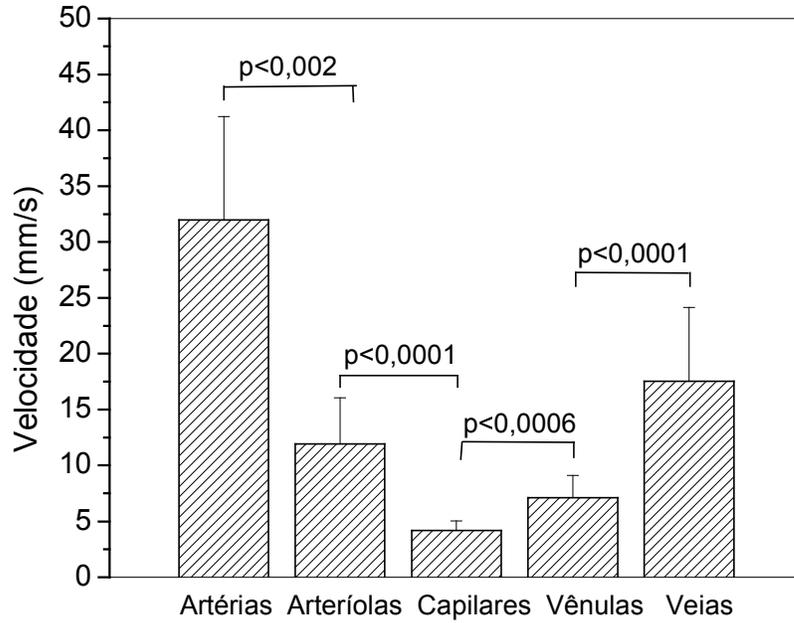


Figura 35. Velocidades obtidas nos diferentes tipos de vasos microcirculatórios nos testes in vivo.

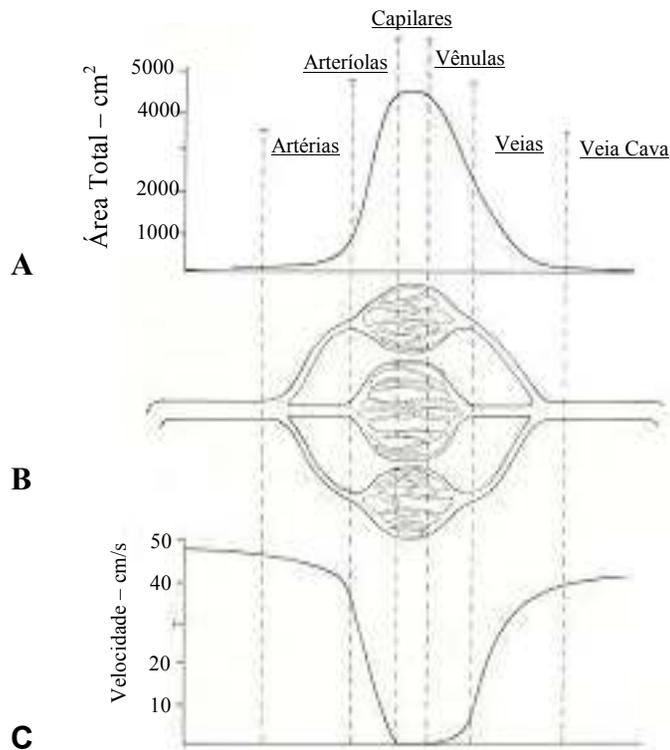


Figura 36. Área de seção transversal estimada (A), organização dos vasos (B) e velocidades lineares dos diferentes tipos de vasos (C). Adaptado de Feigl, 1974.

O sistema cardiovascular é uma rede de ramificações de vasos, onde a principal característica desse padrão é que a área de seção transversal das ramificações é maior que a área de seção transversal do vaso que dá origem as ramificações. A área total de seção transversal no sistema cardiovascular aumenta da aorta para as artérias, arteríolas e capilares. A velocidade linear é dependente do inverso da área total de seção transversal de muitos vasos paralelos. Desse modo, as velocidades médias do fluxo sanguíneo nos pequenos vasos são menores que nas artérias e veias.

É importante ressaltar que o perfil de variação das velocidades obtido experimentalmente (figura 35) é muito similar ao teórico (figura 36.C).

Os valores das velocidades médias em arteríolas e vênulas estão em bom acordo com os reportados por Hoening e Mohr, (1968), para arteríolas na faixa de 0,9–12,9 mm/s, e vênulas na faixa de 0,4–6,6 mm/s. Estudos realizados por Sato e Ohshima, (1988) na microcirculação de um rato, reportaram valores médios de velocidades em arteríolas e vênulas na faixa de 10 mm/s e 5 mm/s respectivamente. Medidas de velocidades de RBCs feitas em arteríolas com a técnica de dupla fenda encontraram valores médios na faixa de 10,0 mm/s (Intaglietta, Tompkins e Richardson, 1979). Estudos realizados por Anand (1999) usando a técnica de *Vídeo Shuttering* e análises de imagens estimaram velocidades médias em arteríolas do músculo retrator do hamster na ordem de 11,1 mm/s, em boa concordância com o encontrado neste estudo. Kobari *et al.* (1984; 1987), descreveram velocidades do fluxo sanguíneo em artérias de gatos entre 3 e 25 mm/s quando o diâmetro era menor que 100  $\mu\text{m}$ . Valores maiores

foram encontrados em artérias no presente trabalho. As diferenças nestes resultados podem estar associadas a diferenças entre espécies.

A velocidade média em capilares arteriais estimada pelo instrumento ficou em torno de  $4,2 \pm 0,9$  mm/s, de acordo com as obtidas por Schmid-Schönbein (1976) em condições normais nos capilares entre 0,5-5 mm/s. No entanto, trabalho recente realizado por Jeong *et al* (2006), utilizando um sistema de câmara de vídeo de alta-velocidade, apresenta velocidades de RBCs em capilares entre 1,25 e 2,95 mm/s e trabalhos realizados por Hudetz (1996, 1997) medindo velocidades de RBCs em capilares cerebrais de ratos, descreveram que 65% de todas as velocidades ficaram na faixa entre 0,5 a 1,8 mm/s, valores menores que os obtidos neste trabalho.

Infelizmente, estudos de velocidades de RBCs realizados anteriormente, não descreveram medidas de velocidades em veias. Conforme pode-se visualizar na figura 35, a área de seção transversal das veias vai diminuindo progressivamente, até chegar próximo do coração, fazendo com que a velocidade aumente.

Estudo realizado por Anand (1999) mostrou que medidas de velocidades *in vivo* não ultrapassam 20 mm/s. Os resultados obtidos nos vasos da rede microvascular são menores que 20 mm/s (figura 35), com exceção das artérias que são vasos de alta velocidade.

# Capítulo V

## Conclusões

Foi construído um novo sistema de medida de velocidade de RBCs na microcirculação, contribuindo, desse modo, para o aprimoramento dos estudos nesta importante parte do sistema cardiovascular, possibilitando a obtenção de novos resultados, os quais permitirão uma melhor compreensão da fisiologia e fisiopatologia associadas aos vasos sanguíneos.

O novo sistema permite uma avaliação em tempo real da velocidade de fluxo, armazenamento dos resultados e é de operação muito mais simples que os sistemas anteriores.

Estudos *in vitro* mostraram um desempenho adequado dos sub-sistemas de correlação.

Em avaliações *in vivo*, o instrumento apresentou resultados satisfatórios, mostrando ser capaz de medir adequadamente uma larga faixa de velocidades em microvasos transiluminados.

Foi elaborado um manual de instrução do instrumento para auxiliar os usuários.

Como sugestões de continuação do trabalho podemos propor o desenvolvimento dos detectores óticos para que o instrumento possa ser implementado nos outros laboratórios do LPM. Outro desdobramento interessante seria a implementação de um algoritmo para perfazer a correlação cruzada

utilizando um DSP, eliminando desse modo, a placa de aquisição de dados. Isto poderia estender a faixa de velocidade medida pelo instrumento.

Esta pesquisa resultou em um trabalho completo apresentado na forma de pôster no XX Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica (São Pedro, São Paulo, novembro de 2006). Um trabalho completo vem sendo preparado para ser submetido ao periódico Review of Scientific Instruments.

## Referências Bibliográficas

Analog Devices, (2002). **Op. Amp. Applications**. Edited by Walter G. Jung.

Anand, A.P. Shruti, A.J. e Pittman, R.N. (1999). **Determination of Red Blood Cell Velocity by Video Shuttering and Image Analysis**. Annals of Biomedical Engineering, Vol. 27, pp. 313-325.

Anliker, M., Casty, M., Friedli, P., Kubli, R., and Keller, H. (1977). In **“Cardiovascular Flow Dynamics and Measurements”** (N.H.C. Hwang and N.A. Norman, eds), pp: 43-88. Univ. Park Press, Baltimore, Maryland.

Araújo, M.P.M., Silva, C.C., Mesquita Júnior, J.A., Santos, J.G., e Melo, P.L. (2002). **Controlador de Temperatura para Ensaios Microcirculatórios em Pequenos Animais**. Trabalho publicado nos Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, pp: 47-50, realizado em São José dos Campos-SP.

Baskurt, O.K., Yalcin, O. e Meiselman, H.J. (2004). **Hemorheology and vascular Control Mechanisms**. Clinical Hemorheology and Microcirculation. 30, 169-178.

Berne, R.M., Levy, M.N., Koeppen, B.M. e Stanton, B.A. (2004). **Fisiologia**. Elsevier Editora Ltda. p. 277-398, 2004.

Beck, M.S. e Plaskowski, A. (1987). **Cross Correlation Flowmeters – their Design and Application**. Ed. Adam Hilger, Bristol.

Bendat, J.S. e Piersol, A.G. (1980). **Random Data, Analysis and Measurement Procedures**. 2d. Ed. John Wiley and Sons.

- Borders, J.I., Brown, W., e Granger, H.J. (1983). **An improved sensor head for cross-correlation intravital velocimetry.** *Microvascular Research*, 26, 347-350.
- Bouskela, E. (1999). ***Vasomotricidade e Endotélio: Alguma Relação? Observação na bolsa da bochecha de hamster.*** Tese apresentada à Universidade do Estado do Rio de Janeiro para concurso para Professor Titular em Fisiologia Cardiovascular.
- Bugliarello, G. e Hayden, J.W. (1962). ***High-speed microcinematographic of blood flow in vitro.***
- Bloch, E. (1962). ***Renaissance in the microcirculation.*** *Am. J. Anat.* 110, 125-153.
- Brandão, A.P. ***Tratando da hipertensão arterial, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares.*** (2000). Adalat Insight Study. *Rev. Bras. Cardiol.* V.2, nº. 5, p. 181-83.
- Brånemark, P.I. e Johnson, I. (1963). ***Determination of the Velocity of corpuscles in Blood Capillaries: A flying spot device.*** *Biorheology*, 1, 143-146.
- Bronzino, J.D., (1986). ***Biomedical engineering and Instrumentation.*** PWS Publishers, New York.
- Chien, S. (1975). ***Biophysical behavior of red cells in suspensions.*** In: *The Red Blood Cell* (2<sup>nd</sup> ed.), edited by D. M. Surgenor. New York Academic, vol. 2, p. 1031-1133.

- Cokelet, G.R., Pries, A.R. e Kiani, M.F. (1998). ***Observations on the accuracy of photometric techniques used to measure some in vivo microvascular blood flow parameters.*** Microcirculation, 5. 61-70.
- Duling, R. (1973). ***The preparation and use of the hamster cheek pouch of studies of the microcirculation.*** Microvascular Research, 5: 423-429.
- Eugene e C. Charles Miguel. (1984). ***Control of microcirculation and blood-tissue exchange.*** DC: Am. Physiol. Soc. sect. 2, vol. IV, chapt. 2.
- Evans, E.A. e Fung, Y.C. (1972). ***Improved measurements of the erythrocyte geometry.*** Microvasc. Res. 4: 335-347.
- Feigl, E.O. (1974) ***Physics of the Cardiovascular System.*** Physiology and Biophysics II. Circulation, Respiration and Fluid Balance. Edited by Ruch, T.C. and Patton, H.D. Chapter 2, pg. 13.
- Fenton, B.M. (1980). ***Topographical Simulation of the Blood Vessels in the Human Bulbar Conjunctiva and Application to Pressure-Flow Relations.*** San Diego: Univ. California Press. Dissertation.
- Flemeling, B.P., Klitzman, B. e Johnson, W.O. (1985). ***Measurement of Erythrocyte Velocity by use of a Periodic Differential Detector.*** The American Physiological Society, H899-H905.
- Gaehtgens, P., Benner, K.U., Schickendantz, S. e Albrecht, K.H. (1976). ***Method for simultaneous determination of red cell and plasma flow velocity in vitro and in vivo.*** Pfluegers Arch. 361: 191-195.

- Goodman, A.H., Guyton, A.C., Drake, R., e Laflin, J.H. (1974). ***A television method for measuring capillary red cell velocities.*** J. Appl. Physiol. 37,126-130.
- Golster, H. Lindén, M., Bertuglia, S., Colantuoni, A. Nilsson, G. e Sjöberg, F. (1999). ***Red Blood Cell Velocity and Volumetric Flow Assessment by Enhanced High-Resolution Laser Doppler Imaging in Separate Vessels of the Hamster Cheek Pouch Microcirculation.*** Microvascular Research, 58, 62-73.
- Goldsmith, H.L. e MARLOW, J.C. (1972). ***Flow Behavior of erythrocytes. I. Rotation and deformation in dilute suspensions.*** Proc. R. London Ser. B 182:351-384,; In: *Handbook of Physiology. Circulation, edited by R. M.*
- Goldsmith, H.L. e Marlow, J.C. (1984). ***Flow Behavior of erythrocytes.*** J. Colloid Interface Sci. 71: 383-407, 1979; In: *Handbook of Physiology. Circulation, edited by R. M. Eugene and C. Charles Miguel, DC: Am. Physiol. Soc., sect. 2, vol. IV, chapt. 2.*
- Goldsmith, H. L. (1984). ***The microrheology of red blood cell suspensions.*** J. Gen. Physiol. 52, Suppl.: 5S-27S, 1968; In: *Handbook of Physiology. Circulation, edited by R. M. Eugene and C. Charles Miguel, DC: Am. Physiol. Soc., sect. 2, vol. IV, chapt. 2.*
- Gore, R.W. e Bohlen, H.G. (1975). ***Pressure regulation in the microcirculation.*** Federation Proc. 34:2931-2937.
- Guyton, A.C., e Hall, J.E. (2002). ***Tratado de Fisiologia Médica.*** Editora Guanabara Koogan S.A. p. 136-173.

Higgins, R.J. ***Digital Signal Processing in VLSI. (1990).*** Analog Devices, ed. by Prentice Hall.

Hoening, W. e Mohr, W. (1968). ***Elektrokardiographische Studien Beim Goldhamster.*** Einem Neverdings Viel Verwendeten Laboratoriumstier. Z Tropenmed Parasit 4:117-21, 1953 (Ger), Vet Bull 24#2074. Publishing in The Golden Hamster Its Biology and use in Medical Research, edited by Roger A. Hoffman, Paul F. Robinson and Hulda Magalhães, first edition.

Hudetz, A.G. Carl, G., Weigle, M. e Fenoy, F.J. (1992). ***Use of Fluorescently Labeled Erythrocytes and Digital Cross-Correlation for the Measurement of Flow Velocity in the Cerebral Microcirculation.*** Microvascular Research, 43, 334-341.

Hudetz, A.G., Feher, G., e Kampine, J.P. (1996). ***Heterogeneous Functional Thoroughfare Channels?*** Microvasc. Res. 51, 131-136.

Hudetz, A.G., Biswal, B.B., Feher, G., e Kampine, J.P. (1997). ***Effects of hypercapnia on capillary flow velocity in the rat verebral cortex.*** Microvasc. Res. 54, 35-42.

Intaglietta, M. e Tompkins, W.R. (1971). ***System for the Measurement of Velocity of Microscopic Particles in Liquids.*** IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering, September, 376-377;

Intaglietta, M., Monti, R. e Timpkins, W.R. (1974). ***Velocity Measurement by Self-tracking Correlator.*** Rev. Sci. Instrum. Vol. 45, N° 5;

- Intaglietta, M., Silverman, N.R., e Tompkins, W.R. (1975). ***Capillary Flow Velocity Measurements in Vivo and in Situ by Television Methods.*** Microvasc. Res. 10, 165-179.
- Intaglietta, M., Tompkins, W.R., e Richardson, D.R. (1979). ***Velocity Measurements in the Microvasculature of the cat omentum by on-line method.*** Microvasc. Res. 2, 462-473.
- Instrumentation for Physiology & Medicine, INC. (1982). ***Velocity Tracker, Mod. 102-B.***
- Jeong, J.H., Sugii, Y., Minamiyama, M. e Okamoto, K. (2006). ***Measurement of RBC deformation and velocity in capillaries in vivo.*** Microvasc. Res. 71(3):212-7.
- Jeurens, T.J.M., Arts, T., Reneman, R.S., e Slaaf, D.W. (1984). ***Electronic Measurement of red Blood Cell Velocity and Volume Flow in Microvessels.*** Med. Biol. Eng. Comput. 22,521-528.
- Jordan, J. Bishop, P. e Kiani, B. (1989). ***Correlation-Based Measurement Systems.*** Ed. By J Willey & Sons.
- Johnson, P.G. (1968). ***Autoregulatory responses of cat mesenteric arterioles measured in vivo.*** Circ. Res. 22: 199-212.
- Johnson, P.C. (1986). ***Microcirculatory Technology.*** Edited by Carleton H. Baker and William L. Nastuk.
- Kiesewetter, H., Ratke, H., Korber, N., e Schmid-Schoenbein, H. (1982). ***Tal calibration of a two-stage prism-grating system for measuring cell velocity.*** Microvasc. Res. 23, 56-66.

Kobari, M., Gotoh, F., Fukuuchi, Y., Tanaka, K., Suzuki, N., e Uematsu, D. (1984).

**Blood Flow Velocity in the pial arteries of cats, with particular reference to the vessel diameter.** J. Cereb. Blood Flow Metabol. 4, 110-114.

Kobari, M., Gotoh, F., Fukuuchi, Y., Tanaka, K., Suzuki, N., e Uematsu, D. (1987).

**Quantitative measurement of Blood Flow Velocity in Feline pial arteries during hemorrhagic hypotension and hypercapnia.** Stroke, 18, 457-463.

Klitzman, B. e Johnson, P.C. (1982). **Capillarity Network Geometry and Red Cell**

**distribution in Hamster Cremaster.** Am. J. Physiol. 242, H211-H219.

Lindén, M. **Can Blood Flow in separate small tubes be quantitatively assessed**

**by high-resolution laser Doppler imaging?** (1997). Med. Biol. Eng. Comput. 35, 575-80.

Lipowsky, H.H. (2005). **Microvascular Rheology and Hemodynamics.**

Microcirculation, 12: 5-15.

Mawson, D.M. e Shore, A.C. (1998). **Comparison of capiflow and frame by**

**frame analysis for the assessment of capillary red blood cell velocity.**

Journal of Medical Engineering & Technology, Vol. 2, Number 2, 53-63.

Ministério da Saúde, Brasil. (1988). Secretária de Programas Especiais de

Saúde/Divisão Nacional de Doenças Crônico-Degenerativas/Programa

Nacional de Educação e Controle da Hipertensão Arterial. Normas Técnicas

para o Programa Nacional de Educação e Controle da Hipertensão Arterial.

Brasília, p. 88.

Munro, P.A.G. (1966). **In Advances in optical and electron microscopy.** R.

Barer and V.E. Cosslet, eds., pp. 1-40. Acad. Press, New York. Ed. by Baker,

C.H., and Nastuk, W.L., (1986). Microcirculatory Tecnology, pp: 149-59.

- Murray, C.J., e Lopez, A.D. (1997). ***Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study***. The lancet, vol. 349: pp. 1489-1504.
- Nitta, J., Koyama, T., Kikuchi, Y., e Shinod, Y. (1983). ***Measurement of erythrocyte flow velocity by means of grating laser microscope***. Jpn. J. Physiol. 33, 377-390.
- Papoulis, A. (1965). ***Probability, Random Variables and Stochastic Processes***. McGraw-Hill.
- Pal, R. (2003). ***Rheology of Concentrated Suspensions of Deformable Elastic Particles such as Human Erythrocytes***. Journal of Biomechanics, 36-981-989.
- Priddy, R.B. e Brodie, A.F. (1984). ***Facial Musculature, nerves and blood vessels of the hamster in relation to the cheek pouch***. J. Morphol. 83: 149-180, 1948. In: *Handbook of Physiology. Circulation, edited by R. M. Eugene and C. Charles Miguel*, DC: Am. Physiol. Soc. 1984, sect. 2, vol. IV, chapt. 2, p. 11-40.
- Sato, M., e Ohshima, N. (1988). ***Velocity Profiles of Blood Flow in Microvessels Measured by ten Channels Dual-sensor Method***. Biorheology, 25; 279-288.
- Schmid-schönben, H. (1976). ***Microrheology of Erythrocytes, blood viscosity, and the Distribution of blood flow in the microcirculation***. In: *International Rev. Of Physiol. Vol IX. Cardiovasc. Physiol. II*. A.C. Guyton and A.W. Cowley, Jr. (Eds.), University Park Press (Baltimore, London, Tokyo), 1-62.

- Schmid-Schoenbein, G.W., e Zweifach, B.W. (1975). ***RBC velocity profiles in arterioles and venules of the rabbit omentum.*** Microvasc. Res. Sep;10 (2) 153-164.
- Slaaf, D.W., Arts, T., Jeurens, T.J.M., Tangelder, G.J. e Reneman, R.S. (1984). ***Electronic measurement of red blood cell velocity and volume flow in microvessels investigative microtechniques in medicine and biology.*** Ed. J. Chayen and L. Bitensky (New York: Marcel Dekker), pp: 327-64. Published in The Physics of Heart and Circulation, 1993. Ed. By Jan Strackee and Nico Westerrhof.
- Slaaf, D.W., Rood, J.P.S., Tangelder, G.J., Jeurens, T.J.M., Alewijnse, R., Reneman, R.S. e Arts, T. (1981). ***A bidirectional optical (BDO) three-stage prism grating system for on-line measurement of red blood cells velocity in microvessels.*** Microvasc. Res. 22, 110-122.
- Slaaf, D., Tangelder, G.J. e Reneman, R. (1993). ***Physics of the Microcirculation.*** The Physics of Heart and Circulation, Publishing by Institute of Physics. Edited by Strackee, I. and Westerhof, N. Bristol, UK. Chapter: 19, pp.383-416.
- Skalak, R., Ozkaya, N. e Skalak, T.C. (1989). ***Biofluid Mechanics.*** Annual Review of Fluid Mechanics. 21, 167-204.
- Svensjö, E. (1978). Bradylinin e Prostaglandin  $E_1$ ,  $E_2$  and  $F_{2\alpha}$  - ***induced macromolecular leakage in the hamster cheek pouch.*** Prostagladins Med. 1:397-410.

- Simionescu, M. e Simionescu, N., (1984). ***Ultrastructure of the microvascular wall: functional correlations***. Handbook of physiology, section 2, the Cardiovascular System, Vol. 4, Microcirculation, part 1 ed E. M. Renkin and C.C. Michel (Bethesda, MD: American Physiological Society) ch. 3 pp: 41-101.
- Stott, A.L. (1987). *Phd Thesis* University of Manchester.
- Tyml, K., e Sherebrim, M.H. (1980). ***A method for on-line measurements of red cell velocity in microvessels using computerized frame-by-frame analysis of television images***. Microvasc. Res. 20, 1-8.
- Tompkins, W.R., Monti, R. e Intaglietta, M. (1974). ***Velocity measurement by self-tracking correlator***. Rev. Sci. Instrum., Vol. 45, N°. 5, 647-649.
- Wayland, H. e Johnson, P.C. (1967). ***Erythrocyte Velocity Measurement in Microvessels by a Two-slit Photometric Method***. J. Appl. Physiol. 22(2): 333-337.
- Wiedeman, M.P. (1963). ***Patterns of the arteriovenous pathways***. In: *Handbook of Physiology*. Circulation, edited by W. F. Hamilton. Washington, DC: Am. Physiol. Soc., sect. 2, vol. II, chapt. 27, p. 891-933.
- Wiedeman, M.P. (1984). ***Architecture Handbook of physiology***, section 2, The Cardiovascular System, vol. 4 Microcirculation, part 1 ed. E. M. Renkin and C.C. Michel (Bethesda, MD: American Physiological Society) ch. 2, pp: 11-40.
- Wiedeman, M.P., Tuma, R. F. e Mayrovitz, H. N., (1981). ***An Introduction to Microcirculation***. New York: Academic; In: *Handbook of Physiology. Circulation, edited by R. M. Eugene and C. Charles Miguel*, DC: Am. Physiol. Soc. 1984, sect. 2, vol. IV, chapt. 2, p. 11-40;

# **ANEXOS**

# **ANEXO A**

# INSTRUMENTAÇÃO PARA ANÁLISE DA VELOCIDADE DE CÉLULAS VERMELHAS NA MICROCIRCULAÇÃO DE PEQUENOS ANIMAIS

J.A.Mesquita Junior<sup>1,2,3</sup>, E. Bouskela<sup>2</sup>, E.Wanjberg<sup>3</sup> e P.L. Melo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Instrumentação Biomédica – Inst. de Biologia e Faculdade de Engenharia - UERJ

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisas em Microcirculação – Instituto de Biologia - UERJ

<sup>3</sup>Coordenação de Física Aplicada – CBPF – Rio de Janeiro - Brasil

Fone: (0XX21) 2587-7773, Fax: (0XX21) 2587-7760

e-mail: [plopes@uerj.br](mailto:plopes@uerj.br)

**Abstract:** An optical velocimeter employing cross correlation has been developed in order to measure the Red Blood Cells (RBCs) velocity in the microcirculation of small animals. The magnified image of the microvessel under investigation is projected and aligned within of the two optical windows placed at a known distance. With the passage of RBCs, two time delayed signals are generated. The determination of this time delay is used to estimate RBCs velocity. The design of the instrument is described, as well as *in vitro* and *in vivo* results obtained with electrical models and small animals, respectively. These results confirmed the high scientific potential of the developed system.

**Palavras-chave:** Instrumentação Biomédica, Microcirculação, Velocidade de Fluxo Sangüíneo.

## Introdução

A microcirculação compreende os vasos sangüíneos e linfáticos com diâmetro inferior a 100  $\mu\text{m}$  [1]. Inúmeros fenômenos fundamentais para a sobrevivência dos organismos ocorrem ao nível da microcirculação, sendo que a medida de velocidade do fluxo sangüíneo na microcirculação é um fator importante para a determinação da oxigenação sangüínea e da concentração de hemoglobina. Estudos da velocidade de eritrócitos encontram diversas aplicações relacionadas à fisiologia da microcirculação [2] e a avaliação da eficiência de medicamentos.

O sangue é uma suspensão de células vermelhas sangüíneas (RBCs), células brancas (leucócitos) e plaquetas no plasma [3]. As RBCs são discos bicôncavos com cerca de 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 1  $\mu\text{m}$  de espessura no centro [4]. Constituindo mais que 99% do particulado de matéria do sangue, as RBCs governam as propriedades do fluxo sangüíneo [3].

Os métodos de medidas de velocidade sangüínea na microcirculação se baseiam na observação de que na circulação capilar, as RBCs passam em fila única, com um espaçamento irregular de plasmas entre elas. Uma vez que estes padrões se mantêm constantes em distâncias curtas, eles podem ser empregados na determinação do tempo de trânsito em uma distância conhecida [4]. A análise destes padrões é usualmente

efetuada empregando dois sensores ópticos posicionados em janelas ópticas no centro da imagem do vaso separados por uma distância conhecida ( $\Delta x$ ). A figura 1 esquematiza este método.

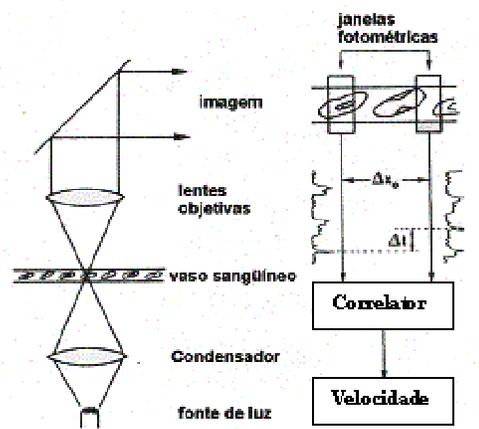


Figura 1: Esquema da instrumentação empregada na estimativa de velocidade do sangue pelo método da correlação temporal.

A intensidade luminosa recebida pelos sensores ópticos é modulada pela passagem das RBCs resultando em sinais semelhantes, porém apresentando um atraso no tempo inversamente proporcional à velocidade do fluxo sangüíneo. O tempo de trânsito das RBCs entre os dois pontos onde estão posicionados os sensores ( $\Delta t$ ) é obtido por meio da estimativa do máximo valor apresentado pela correlação cruzada entre os sinais [5].

A maioria dos sistemas atualmente empregados na avaliação da velocidade de fluxo na microcirculação empregam técnicas baseadas em sistemas analógicos [5]. Brånemark e Jonsson [6] desenvolveram um método de mancha voadora que utiliza técnicas de vídeo. Munro [7], desenvolveu um método óptico baseado em prisma rotativo. Estes métodos dependem da habilidade do pesquisador e são limitados em condições onde somente uma única célula pode ser seguida no campo de visualização [8].

Wayland and Johnson [8] desenvolveram o método de dupla fenda, que permite gravações contínuas da velocidade e não depende da habilidade do pesquisador.

No entanto, este método depende da gravação em fita magnética e da utilização de computadores analógicos.

Neste contexto, este trabalho descreve o projeto e a análise do desempenho de um instrumento capaz de medir a velocidade de RBCs na microcirculação de pequenos animais.

## Materiais e Métodos

**Descrição do Correlator** - O projeto do correlator foi baseado no trabalho de Stott [9] e reportado por Beck [10]. O projeto levou em consideração os parâmetros do sistema, tais como: distância entre os sensores ( $L=10\ \mu\text{m}$ ), o que corresponde aproximadamente ao diâmetro de uma RBC; velocidade mínima ( $V_{\min}=0,2\ \text{mm/s}$ ) e máxima ( $V_{\max}=50\ \text{mm/s}$ ); erro no pior caso: 2% [10]. As velocidades mínimas e máximas foram fornecidas por profissionais da área biomédica envolvidos com estudos na área de microcirculação. A partir de ( $V_{\min}$ ), ( $V_{\max}$ ) e de ( $L$ ), foram determinados os atrasos mínimo ( $\tau_{\min}$ ) e máximo ( $\tau_{\max}$ ), utilizando a relação  $v=\Delta x/\Delta t$ , correspondendo a  $\tau_{\min} = 200\ \mu\text{s}$  e  $\tau_{\max} = 50\ \text{ms}$ . A partir do erro no pior caso para detecção do pico, foi determinado o número mínimo de pontos ( $n_{\min}$ ), o que correspondeu a  $n_{\min} = 25$  pontos. Da relação entre as velocidades mínima e máxima, determinou-se a faixa do instrumento ( $R_g=250$ ). O número máximo de pontos está relacionado com a faixa e  $n_{\min}$ , através da relação  $R=n_{\max}/n_{\min}$ , onde  $n_{\max}=6250$  pontos. Da relação  $V_{\max}=L/n_{\min}\delta t$ , determinou-se a resolução temporal do instrumento, correspondendo a  $\delta t = 8\ \mu\text{s}$ , resultando numa frequência de amostragem igual a 125 kHz. O diagrama em blocos dos sub-sistemas do correlator está descrito na Figura 2.

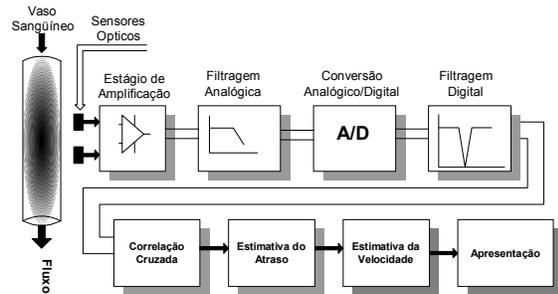


Figura 2: Diagrama em blocos do instrumento.

O aparato contendo os sensores ópticos é acoplado ao microscópio (Leica Microsystems, 020-518.500 DM/LS) e as janelas ópticas são alinhadas no centro do leito do vaso sob interesse, que corresponde ao ponto de maior velocidade [11]. Os sinais oriundos da passagem das RBCs são captados pelos fotodetectores e amplificados por amplificadores de ultra-baixo ruído e alta velocidade (AD OP-27). Em seguida, os sinais são entregues a um segundo estágio de amplificação, construído em torno do CI TL082, elevando os sinais fotométricos a um nível adequado para sua digitalização e processamento. Em seguida, os sinais são adaptados a um filtro analógico cuja banda-passante foi dimensionada de modo a garantir que o instrumento

tenha resposta dinâmica suficiente para medir as componentes de velocidade variantes no tempo, minimizando o erro médio quadrático [12], ( $f_c=10\ \text{kHz}$ , 5ª ordem Butterworth). Após esta etapa, os sinais são acoplados a uma placa de aquisição de dados (National Instruments) PCI 6024, 16 canais e 12 bits. Esta placa está conectada em um computador Pentium IV, 2,4 GHz, 256 MB de RAM, com gravador de CD, monitor de 17", entre outros periféricos.

O programa foi implementado em linguagem de programação G, ambiente LabVIEW™, versão 5.1. O painel frontal do instrumento é apresentado na Figura 3.

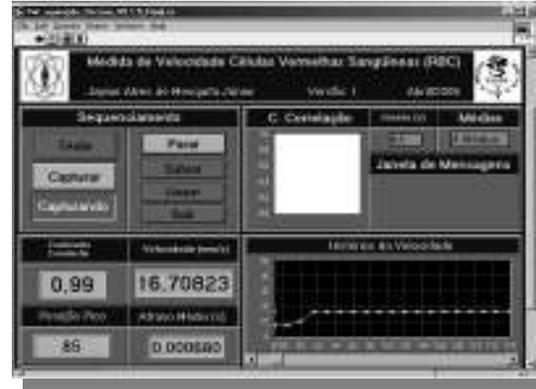


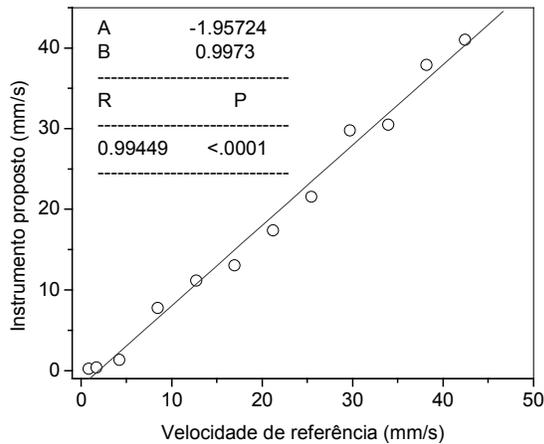
Figura 3: Painel frontal do instrumento.

O sistema de iluminação do microscópio é composto por uma lâmpada AC. Deste modo, a etapa de processamento inclui inicialmente uma rotina de filtragem digital para eliminação dos sinais espúrios oriundos da iluminação do microscópio (Filtros *notch*, 8ª ordem nas frequências de 60 Hz, 120 Hz e 240 Hz). Em seguida, os sinais são entregues à rotina que perfaz a estimativa da correlação cruzada. Os dados são aceitos se o coeficiente de correlação é maior que 0,7 [13]. A estimativa do atraso temporal ( $\Delta t$ ) é obtida multiplicando a diferença entre o índice da amostra relativa ao máximo e o número de amostras adquiridas pelo intervalo de amostragem. Uma rotina perfaz a estimativa da velocidade utilizando a relação  $\Delta v=\Delta x/\Delta t$ .

**Testes em modelos elétricos (*in vitro*)** – O desempenho dos subsistemas dedicados a correlação foi avaliada por meio da análise de sinais com atrasos conhecidos. Para este fim, foi implementado um gerador de onda quadrada estável, baseado em cristal, utilizando filtragem passa-baixas de 1ª ordem. Foram implementadas quatro linhas de retardo analógicas com atrasos de 250  $\mu\text{s}$ , 15 ms, 30 ms e 50 ms, correspondentes à faixa de  $\tau_{\min}$  e  $\tau_{\max}$  que serão encontradas em aplicações práticas. As calibrações dos atrasos foram obtidas utilizando um osciloscópio digital (Tektronics, TDS220).

**Calibração** - A calibração foi efetuada empregando um microscópio (descrito anteriormente), uma bomba de perfusão (Harvard Apparatus, 55-2222), uma seringa de 10 ml, um cateter para pequenos animais com diâmetro

igual a 0,5 mm e uma suspensão de pó de grafite em óleo de silicone. O sistema óptico foi adaptado ao microscópio e alinhado no centro do leito do cateter através do circuito fechado de TV. Utilizando a equação da continuidade [14], a bomba foi ajustada de modo a produzir no cateter velocidades entre aproximadamente 1 e 40  $\mu\text{l/s}$ . A figura 4 apresenta a curva de calibração



do instrumento.

Figura 4. Curva de calibração do instrumento.

A correlação entre os valores de velocidade obtidos no sistema de referência ( $V_{ref}$ ) e no elaborado no presente projeto ( $V_p$ ) foi muito próxima de 1 ( $R=0,994$ ), sendo que os erros descritos pela reta obtida pelo método dos mínimos quadrados ( $V_p = -1,957 + 0,997V_{ref}$ ) foram posteriormente corrigidos.

**Testes *in vivo*** - Foram avaliadas as velocidades em 10 artérias, 10 veias, 10 arteríolas e 10 vênulas na microcirculação de hamsters normais, com massa corporal em torno de 130 g. Os animais foram induzidos à anestesia com pentobarbital sódico e mantidos anestesiados com  $\alpha$ -cloralose. Durante a preparação e o experimento os animais tiveram a temperatura corporal mantida em 36,5 °C com manta aquecedora controlada por termistor [15] e a traquéia foi canulada para garantir a respiração espontânea. A bolsa da bochecha foi preparada conforme técnica de Duling [16] e adaptada por Svensjö [17] e após foi transferida para o microscópio. O tecido foi transluminado e a imagem do vaso sob interesse foi alinhada no plano focal do microscópio através de uma objetiva com magnificação de 10X (.22) e monitorada pelo circuito fechado de televisão. A Figura 5 mostra o aparato utilizado.

### Resultados e discussão

**Testes *in vitro*** - A análise dos erros nos estágios de correlação são apresentados na Tabela 1. Os erros foram menores que 1%, sendo adequados à aplicação visada.

**Teste *in vivo*** - A figura 6 apresenta os resultados destes experimentos (média  $\pm$  desvio-padrão), mostrando uma queda significativa da velocidade com o tipo de vaso estudado (ANOVA,  $p < 0,0001$ ). Este fenômeno é

coerente com as progressivas quedas de pressão nos vasos analisados [18], assim como com o aumento da resistência ao fluxo devido à redução de área de seção transversal que ocorre nos vasos sanguíneos [19].



Figura 5: Aparato utilizado nos ensaios *in vivo*.

Tabela 1 - Resultados da avaliação de modelos elétricos.

Atrasos	Correlator (s)	Erro (%)
250 $\mu\text{s}$	0,000248	0,8
15 ms	0,015012	0,079
30 ms	0,030038	0,12
49 ms	0,048775	0,46

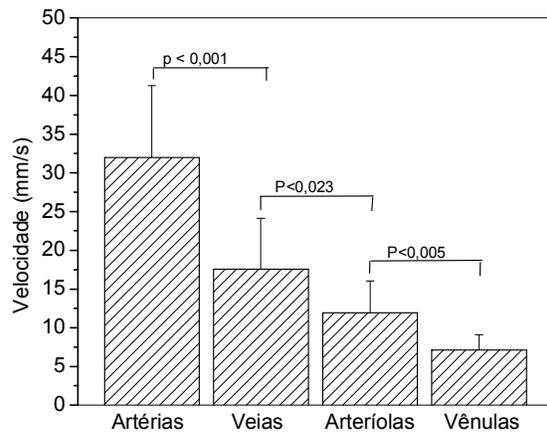


Figura 6. Velocidades obtidas nos testes *in vivo*.

Estudos realizados em hamsters por Slechta e Fulton [20] mostraram velocidades em arteríolas entre 0,9-12,9 mm/s e em vênulas entre 0,4-6,6 mm/s. Os resultados do presente trabalho mostraram uma queda significativa de velocidade entre os vasos citados ( $p < 0,005$ ) e são consistentes com os reportados pelos autores citados. Valores de velocidades semelhantes em arteríolas e vênulas foram também reportados por Sato [21]. ]

A Figura 6 mostra que foram avaliadas velocidades em torno de 5 a 45 mm/s com o sistema proposto. Anand *et al.* ressaltam que velocidades até 20 mm/s são suficientes para muitas medidas microvasculares [22]. No entanto, os resultados descritos na Figura 6 sugerem que, em hamsters, a faixa citada é suficiente apenas para

medidas de velocidades de RBCs em arteríolas e vênulas.

### Conclusão

Foi construído um novo sistema de medida de velocidade de RBCs na microcirculação, contribuindo, desse modo, para o aprimoramento dos estudos nesta importante parte do sistema cardio-vascular.

Estudos *in vitro* mostraram um desempenho adequado dos sub-sistemas de correlação.

Em avaliações *in vivo*, o instrumento apresentou resultados satisfatórios, mostrando ser capaz de medir adequadamente uma larga faixa de velocidades em microvasos transluminados.

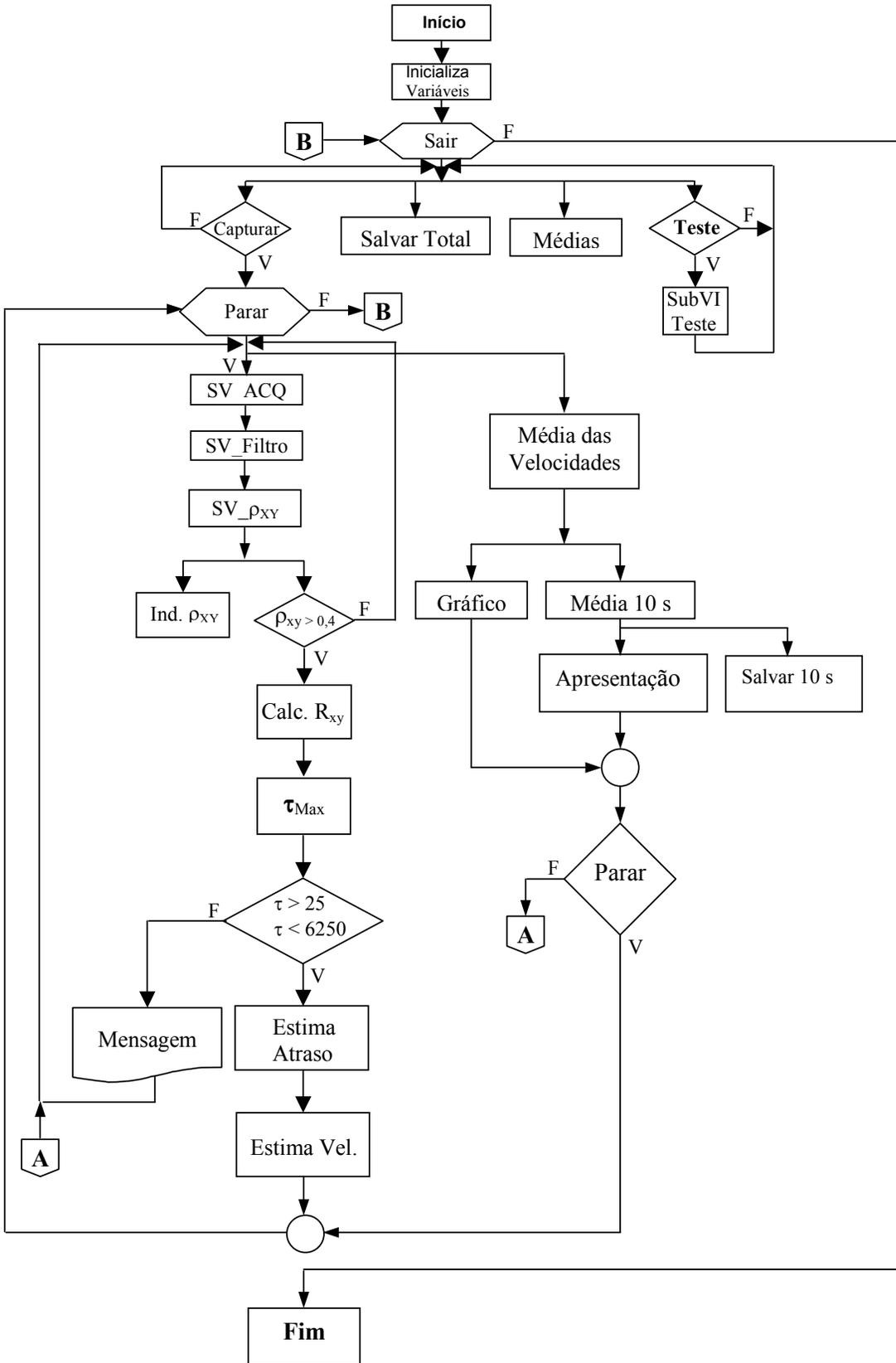
### Agradecimentos

Aos pesquisadores do Laboratório de Pesquisas em Microcirculação pelo auxílio na realização dos experimentos. Ao Laboratório de Sistemas de Medidas (CBPF) e ao CNPq e a FAPERJ pelo apoio financeiro.

### Referências

- [1] Bouskela, E. (1999) "Vasomotricidade e Endotélio: Alguma Relação? Observação na Microcirculação da Bolsa da Bochecha de Hamster". Tese apresentada à Universidade do Estado do Rio de Janeiro em concurso para Professor Titular em Fisiologia Cardiovascular.
- [2] Fleming, B. P. Klitzman, B. and Johnson, W. O. (1985) "Measurement of Erythrocyte velocity by use of a periodic differential detector". *Am Physiol Soc*, H899-H905.
- [3] Pal, R. (2003) "Rheology of Concentrated Suspensions of Deformable Elastic Particles such as Human Erythrocytes". *J Biomec*, v. 36, pp.981-989.
- [4] Slaaf, D., Tangelder, G.J. e Reneman, R. (1993) "Physics of the Microcirculation", capítulo 19, *in* "The physics of heart and circulation" ed. Strackee, J. e Westerhof, N. Institute of Physics, Bristol, USA.
- [5] Intaglietta, M. and Tompkins, W.R. (1971) "System for the Measurement of Velocity of Microscopic Particles in Liquids". *IEEE Trans. Biom. Eng.*, no. 18(5), pp 376-379.
- [6] Brånemark, P.I. and Jonsson, I. (1963) "Determination of the velocity of corpuscles in blood capillaries: A flying spot device". *Biorheology*, v.1, pp. 143-146.
- [7] Munro, P.A.G. (1966) "Methods for Measuring the Velocity of Moving Particles under the Microscope". *In: Advances in Optical and Electron Microscopy*, edited by R. Barer and V.E. Cosslett. New York: Academic, v. I, pp. 1-40.
- [8] Wayland, H. and Johnson, P.C. (1967) "Erythrocyte Velocity Measurement in Microvessels by a two-slit Photometric Method". *J. Appl. Physiol.* v.22 (2), pp. 333-337.
- [9] Stott, A.L. (1987), *PhD Thesis*, University of Manchester.
- [10] Beck, M.S., and Plaskowski, A. (1987) "Cross Correlation Flowmeters Their Design and Application". Editora Adam Hilger, Bristol, Inglaterra.
- [11] Sissom L. e Pitts, D.R. (1988) "Fenômenos de transporte". Editora Guanabara.
- [12] Bendat, J. S. and Piersol, A. G. (1980) "Random Data, Analysis and Measurement Procedures". 2d ed.. John Wiley and Sons.
- [13] Hudetz, A.G., Weigle, C.G.M., Fenoy, F.J. and Roman, R.J. (1992) "Use of Fluorescently Labeled Erythrocytes and Digital Cross-Correlation for the Measurement of Flow Velocity in the Cerebral Microcirculation". *Microv Res*, v.43, pp. 334-341.
- [14] Resnick, R. and Halliday, D. (1984) "Física 2". Editora Livros Técnicos e Científicos, 4ª Edição.
- [15] Araújo, M.P.M., Silva, C.C., Mesquita Júnior, J.A., Santos, J.G. e Melo, P.L. (2002) "Controlador de Temperatura para Ensaio Microcirculatórios em Pequenos Animais". *Anais do XVIII CBEB*, pp. 47-50, São José dos Campos - SP.
- [16] Duling, R. (1973) "The preparation and use of the hamster cheek pouch of studies of the microcirculation". *Microv Res* v.5, pp. 423-429.
- [17] Svensjö, E. (1978) "Bradylinin and Prostaglandin E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub> - induced macromolecular leakage in the hamster cheek pouch". *Prostaglandins Med.* v.1, pp.397-410.
- [18] Berne, R.M., Levy, M.N., Koeppen, B.M. e Stanton, B.A. (2004) "Fisiologia". Editora Elsevier, 5ª edição.
- [19] Guyton, A.C. e Hall, J.E. (1996) "TextBook of Medical Physiology". W.B. Saunders Company, ninth edition.
- [20] Slechta, R.F., Fulton, G.P. "Blood Flow Rates in Small Vessels of the Hamster Cheek Pouch". *Proc Soc Exp Biol Med* 112:1076-8. *In* "The Golden Hamster its biology and use in medical research". Edited by Roger A. Hoffman, Paul F. Robinson and Hulda Magalhães.
- [21] Sato, M. and Ohshima, N. (1988) "Velocity Profiles of Blood Flow in Microvessels Measured by ten Channels' Dual-Sensor Method. *Biorheology*, 25; 279-288.
- [22] Anand, A. P., Shruti, A.J. and Roland, N.P. (1999) "Determination of Red Blood Cell Velocity by Video Shuttering and Image Analysis". *Annals of Biom Eng.* v. 27, pp. 313-325.

# **ANEXO B**



# **ANEXO C**

