

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRIELLE ELAINE CAPOTE



**EFEITOS DO DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL SOBRE A
EVOLUÇÃO TEMPORAL DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA
CARDÍACA**

CURITIBA

2015

ANDRIELLE ELAINE CAPOTE

**EFEITOS DO DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL SOBRE A
EVOLUÇÃO TEMPORAL DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA
CARDÍACA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia, área de concentração em Fisiologia das Células Excitáveis, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Lavezzo Dias

CURITIBA

2015

Capote, Andrielle Elaine

Efeitos do Diabetes Mellitus experimental sobre a evolução temporal da variabilidade da frequência cardíaca. / Andrielle Elaine Capote. – Curitiba, 2015.

78f. : il. ; 30cm.

Orientador: Fernando Augusto Lavezzo Dias

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Diabetes. 2. Eletrocardiografia. 3. Frequência Cardíaca. I. Título. II. Dias, Fernando Augusto Lavezzo. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 612




Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



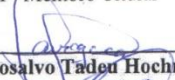
Ata da defesa de dissertação de mestrado de ANDRIELLE ELAINE CAPOTE

Aos vinte e um dias do mês de agosto do ano de dois mil e quinze, foi realizada no Auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação da mestranda **Andrielle Elaine Capote**, intitulada **“EFEITOS DO DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL SOBRE A EVOLUÇÃO TEMPORAL DA VARIABILIDADE DA FREQUENCIA CARDIACA”**. A abertura teve início às 14h00min pelo Presidente da Banca Examinadora e Orientador da candidata, Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias. O Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou à palavra a aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, o Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias passou à palavra a primeira examinadora, Professora Doutora Camila Maciel de Oliveira do departamento de Fisiologia da UFJF. Na sequência, passou à palavra ao segundo examinador, Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça do Departamento de Fisiologia da UFPR. A aluna respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, o Presidente, Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela **“APPROVAÇÃO”**, habilitando-a ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, a qual assino juntamente com os senhores examinadores.

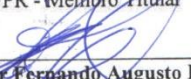
Curitiba, 21 de agosto de dois mil e quinze.



Professora Doutora Camila Maciel de Oliveira
UFJF - Membro Titular



Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça
UFPR - Membro Titular



Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora
Centro Politécnico - Caixa Postal 19031 - CEP: 81531-990 - Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1714 - Fax (41) 3361-1714 - fisiologia@ufpr.br
www.bio.ufpr.br

Difícil mesmo é dedicar apenas um mestrado a quem nos dedicou a sua própria vida, sua juventude, muitas noites de sono, até mesmo renunciou muitas vezes suas vontades, por mim, para que nunca me faltasse nada e não faltou, o que sobrou eu espero estar devolvendo em forma de amor, amor que mesmo a quilômetros de distância está embargado em cada exclamação de:

‘Que saudades’! A vocês meu pai e minha mãe, eu dedico não só este trabalho, mas a gratidão de uma vida toda!

AGRADECIMENTOS

À minha família, agradeço a Deus por ter me colocado em um lar onde o amor foi sempre a base para cada uma de nossas conquistas. Pelo exemplo de vida dos meus pais, que mesmo sem terem terminado os estudos nos deram a oportunidade de ver em nós o sonho deles mesmo se realizando, que eu possa repassar metade de todo o amor que vocês nos deram. Aos meus irmãos Luiz Fernando e Francieli, que foram meus primeiros amigos, meus exemplos, meus espelhos, encorajadores desde o início que comemoram comigo cada degrau escalado, vocês são e sempre serão os melhores amigos que a vida me deu. Obrigada por todo o apoio, sem vocês eu não teria nem começado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Augusto Lavezzo Dias, pela oportunidade de ser sua aluna, pela confiança, por toda a paciência que se é necessária ao orientar mulheres (isso é culpa dos hormônios), em especial obrigada por todo conhecimento que me transmite em todas as conversas, explicações, correções, essa bagagem levarei para sempre.

Ao prof. Dr. Fogaça, por toda a ajuda na parte “elétrica” do projeto, que com sua calma e serenidade, sempre consegue nos incentivar de maneira a querermos cada vez mais entender os segredos da fisiologia do coração.

Ao meu colega de laboratório e irmão que a pós-graduação me deu, Diego Neves Araújo, obrigada por toda a ajuda, ensinamento, paciência, conselhos e principalmente sua amizade e ajuda em todo decorrer do meu mestrado, você tem paciência de sobra, parabéns!

Aos colegas de laboratório Eduardo Gomes, Luiz Gorski, João Peixoto, Sérgio, Jessica, Ana Flávia e Audrin, que me ajudaram durante as muitas fases dos experimentos desse mestrado, obrigada também pelas conversas descontraídas que me faziam esquecer os problemas e dar boas risadas.

Em especial as minhas inicialmente colegas de pós-graduação, que se tornaram grandes amigas no decorrer desses dois anos, Sthéfanie Dassi, Stefani Fischer, Dagliane Pagliosa, Amanda Venturelli e Leticia Garcia, obrigada por todos os conselhos, risadas, almoços, jantares, parcerias que vou levar pra vida. Agradeço também a prof. Dra. Marcia Appel, pelos conselhos, dicas, ensinamentos e até choros, obrigada pela amizade enfim.

As minhas ex-colegas de casa, Raíssa Basso e Gabriela Deleu sem dúvida vocês ouviram muitos dos meus medos, preocupações, choros, desesperos (e quantos hein?), obrigada pela parceria nesses dois anos, vocês foram de alguma forma minha família em Curitiba.

Obrigada a minhas amigas que mesmo distantes estão sempre do meu lado, nos conselhos, nas correções, no desespero e na alegria também que ninguém é de ferro. Em especial a você Walkyria Fernandes, obrigada por tudo mesmo, pelo incentivo desde a prova do mestrado, que foi só aumentando em cada fase concluída e agora veja só estou concluindo e você sempre aqui. Miriam Takemoto, obrigada pelas visitas, pelas consultas, pelos conselhos, por sempre tentar me passar a calma oriental que você tem ai dentro.

Ao programa de Pós Graduação em Fisiologia, CAPES e Fundação Araucária pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, a todos que me ajudaram de alguma forma.

“Tudo que é seu encontrará uma maneira de chegar até você!”
(Chico Xavier)

RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) é descrito como um grupo heterogêneo de alterações metabólicas que tem em comum a hiperglicemia, apresenta alta taxa de morbidade e mortalidade, além de ser um fator de risco para diversas complicações, em especial as cardiovasculares, cerebrovasculares e as neuropatias. As neuropatias acometem grande parte dos pacientes diabéticos, entre elas a neuropatia autonômica cardíaca (NAC) é uma das mais preocupantes, pois está relacionada à maior risco de desenvolvimento de doenças cardíacas e à mortalidade nesta população. A variabilidade da frequência (VFC) cardíaca tem sido utilizada para o diagnóstico da NAC. Dessa forma, a caracterização das alterações temporais da VFC e investigação de NAC são de fundamental importância para a compreensão de alterações autonômicas decorrentes do DM. O objetivo do presente estudo foi avaliar a progressão temporal da disfunção autonômica cardíaca, em curto prazo, consequente ao DM experimental induzido por estreptozotocina (STZ). A amostra foi composta por 40 ratos machos da raça Wistar, divididos aleatoriamente em dois grupos: Grupo Controle (GC) e Grupo Diabético (GD). Todos os animais foram submetidos à cirurgia de implantação de eletrodos para aquisição dos sinais eletrocardiográficos, para análise da VFC temporal, nas primeiras 48 horas, e posteriormente a cada três dias até o 26º dias após a indução do DM. Ao fim desse período, foi realizada a avaliação da função cardíaca, utilizando a técnica de coração isolado e posterior análise histológica do miocárdio. Animais DM apresentaram redução característica da frequência cardíaca desde a primeira semana pós-indução. Os dados de VFC foram analisados através do cálculo da integral e posterior regressão linear. Foi observada alterações na VFC global representada pelos índices SDNN e SD2 iniciadas ao redor do 14º dia pós DM. O balanço simpato-vagal também começa a se modificar ao redor do 12º dia com diminuição do estímulo parassimpático. Em corações isolados, a frequência intrínseca estava reduzida no DM e sinais de disfunção diastólica, avaliada pela dP/dt_{\min} , foi observado. Nos dados histológicos do tecido cardíaco, não houve alterações nem de espessura ventricular esquerda, nem de diâmetro dos cardiomiócitos. Conclui-se que alterações precoces na VFC, representadas por diminuição global da VFC e alterações do balanço simpato-vagal ocorrem no modelo experimental de DM. A drástica redução da frequência cardíaca nos animais diabéticos pode ter influência autonômica; contudo, este estudo demonstrou alterações da frequência intrínseca como outro componente responsável por esta alteração.

Palavras-Chave: Diabetes Mellitus, Variabilidade da Frequência Cardíaca, Eletrocardiograma.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is described as a heterogeneous group of metabolic abnormalities that have in common hyperglycemia. It presents high morbidity and mortality, besides being a risk factor for cardiovascular and cerebrovascular complications and neuropathies. Neuropathies affect many diabetic patients and cardiac autonomic neuropathy (CAN) is one of the most worrying, because it is related to higher risk of heart disease development and mortality in this population. The heart rate variability (HRV) has been used for diagnosis of CAN. Thus, characterization of temporal changes in HRV and CAN are important for understanding autonomic changes resulting from DM. The aim of this study was to evaluate temporal progression of short-term cardiac autonomic dysfunction, after experimental streptozotocin (STZ)-induced DM. Sample consisted of 40 male Wistar rats, randomly divided into two groups: Control Group (CG) and Diabetic Group (DG). All animals underwent surgery for electrodes implantation for acquisition of ECG signals to analyze temporal HRV at the first 48 hours and then every three days in a period of 26 days after DM induction. After that period, assessment of cardiac function was performed by isolated heart technique and subsequent histological analysis of myocardial. DM animals showed characteristic heart rate reduction since the first post-induction week. HRV data were analyzed by calculating the integral and subsequent linear regression. It was observed changes in overall HRV represented by SDNN and SD2 indexes started around the 14th day after DM. The sympathovagal balance also begins to change around the 12th day with decreased parasympathetic stimulation. In isolated hearts, the intrinsic rate was decreased in DM and signs of diastolic dysfunction assessed by dP/dt_{min} was observed. In histological analysis of heart tissue, there were no changes in left ventricular thickness or cardiomyocytes diameter. It's concluded that early changes in HRV, represented by decrease of overall HRV and changes in sympathovagal balance occur in the experimental model of DM. The drastic reduction in heart rate in diabetic animals may have autonomic influence, however, this study demonstrated changes in the intrinsic heart rate as another component responsible for this change.

Keywords: Diabetes Mellitus, Heart Rate Variability, Electrocardiogram.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ELETRODO TIPO CLIP SUBCUTÂNEO	32
FIGURA 2 -	MASSA CORPORAL NA PROGRESSÃO DO DM	38
FIGURA 3 -	GLICEMIA SANGUÍNEA NA PROGRESSÃO DO DM	39
FIGURA 4 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DA FREQUÊNCIA CARDÍACA NA INDUÇÃO DO DM	40
FIGURA 5 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DA FC APÓS INDUÇÃO DO DM ATRAVÉS DA ANÁLISE DA INTEGRAL DA FC DO DIA 0 AO DIA 26	40
FIGURA 6 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DO ÍNDICE SDNN NO DM	41
FIGURA 7 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DO ÍNDICE SDNN NO DM ATRAVÉS DA ANÁLISE DA INTEGRAL DA FC DO DIA 0 AO DIA 26	42
FIGURA 8 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DO ÍNDICE RMSSD NO DM	42
FIGURA 9 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DO ÍNDICE RMSSD NO DM ATRAVÉS DA ANÁLISE DA INTEGRAL DA FC DO DIA 0 AO DIA 26	43
FIGURA 10 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DA RAZÃO LF/HF NO DM	43
FIGURA 11 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DA RAZÃO LF/HF NO DM ATRAVÉS DA ANÁLISE DA INTEGRAL DA FC DO DIA 0 AO DIA 26	44
FIGURA 12 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DO ÍNDICE LF NO DM	44
FIGURA 13 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DO ÍNDICE LF NO DM ATRAVÉS DA ANÁLISE DA INTEGRAL DA FC DO DIA 0 AO DIA 26	45
FIGURA 14 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DO ÍNDICE HF NO DM	46

FIGURA 15 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DO ÍNDICE HF NO DM ATRAVÉS DA ANÁLISE DA INTEGRAL DA FC DO DIA 0 AO DIA 26	46
FIGURA 16 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DO ÍNDICE SD1 NO DM	47
FIGURA 17 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DO ÍNDICE SD1 NO DM ATRAVÉS DA ANÁLISE DA INTEGRAL DA FC DO DIA 0 AO DIA 26	47
FIGURA 18 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DO ÍNDICE SD2 NO DM	48
FIGURA 19 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DO ÍNDICE SD2 NO DM ATRAVÉS DA ANÁLISE DA INTEGRAL DA FC DO DIA 0 AO DIA 26	48
FIGURA 20 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DO ÍNDICE ENTROPIA DE SHANNON NO DM	49
FIGURA 21 -	PROGRESSÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES DO ÍNDICE ENTROPIA DE SHANNON NO DM ATRAVÉS DA ANÁLISE DA INTEGRAL DA FC DO DIA 0 AO DIA 26	49
FIGURA 22 -	EFEITO DO DM NA PRESSÃO DESENVOLVIDA NO VENTRÍCULO ESQUERDO DE RATOS	51
FIGURA 23 -	EFEITOS DO DM NA VELOCIDADE DE GERAÇÃO DE PRESSÃO INTRAVENTRICULAR ($DF/DT_{MÁX}$) E NA VELOCIDADE MÁXIMA DE RELAXAMENTO ($DP/DT_{MÍN}$) EM CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS	52
FIGURA 24 -	EFEITOS DO DM SOBRE A ESPESSURA DA PAREDE VENTRICULAR ESQUERDA	52
FIGURA 25 -	EFEITOS DO DM NO DIÂMETRO DOS CARDIOMIÓCITOS	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	DADOS ELETROCARDIOGRÁFICOS NOS MOMENTOS PRÉ E PÓS-INDUÇÃO DO DM OU TAMPÃO VEÍCULO.....	50
-------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

LISTA DE SIGLAS

AGE	-	Advanced-glycation products (Produtos de Glicação Avançada)
ApEn	-	Entropia Aproximada
CEUA	-	Comitê de Ética no Uso Animal
CONCEA	-	Conselho Nacional de Experimentação Animal
DM	-	Diabetes Mellitus
DM1	-	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	-	Diabetes Mellitus Tipo 2
ECG	-	Eletrocardiograma
FC	-	Frequência Cardíaca
FFT	-	Fast Fourier Transform (Transformada Rápida de Fourier)
GC	-	Grupo Controle
GD	-	Grupo Diabético
HE	-	Hematoxilina-eosina
HF	-	High Frequency (Alta Frequência)
LF	-	Low Frequency (Baixa Frequência)
LF/HF	-	Balanco Simpato-Vagal
MCD	-	Miocardiopatia Diabética
MEC	-	Matriz Extracelular
NAC	-	Neuropatia Autonômica Cardíaca
NAD	-	Neuropatia Autonômica Diabética
Na/K	-	Sódio/Potássio
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
PA	-	Pressão Arterial
PND	-	Polineuropatia Diabética Distal Sensório-motora
pNN50	-	Percentual de intervalos RR normais que diferem mais que 50 milissegundos do seu adjacente
PDVE	-	Pressão Desenvolvida pelo Ventrículo Esquerdo
RMSSD	-	Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes
RR médio	-	Média de todos os intervalos RR normais

- SD** – Média \pm Desvio Padrão
- SD1** – Registro instantâneo da VFC batimento a batimento na análise de Poincaré
- SD2** – Registro de longa duração da VFC na análise de Poincaré
- SDANN** – Desvio padrão das médias dos intervalos RR calculados em intervalos de 5 minutos
- SDNN** – Desvio padrão da média de todos os intervalos RR normais
- SDNNi** – Média dos desvios padrões da média de intervalos RR normais calculados em intervalos de 5 minutos
- SNA** – Sistema Nervoso Autônomo
- STZ** – Estreptozotocina
- ULF** – Ultra Low Frequency (Frequência Ultra Baixa)
- VFC** – Variabilidade da Frequência Cardíaca
- VLF** – Very Low Frequency (Frequência Muito Baixa)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 DIABETES MELLITUS	18
1.2 COMPLICAÇÕES DO DIABETES MELITTUS	19
1.2.1 PATOGENIA DAS NEUROPATIAS	21
1.2.2 PATOGENIA DA MIOCARDIOPATIA DIABÉTICA	23
1.2 AVALIAÇÃO DA NEUROPATIA AUTONÔMICA CARDÍACA PELA ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA	24
1.3.1 MÉTODOS LINEARES	26
1.3.2 MÉTODOS NÃO-LINEARES	28
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. METODOLOGIA	31
4.1 Delineamento experimental	31
4.2 Cirurgia de implantação de eletrodos	32
4.3 Indução do diabetes por estreptozocina	33
4.4 Mensuração dos sinais eletrocardiográficos e variabilidade da frequência cardíaca	33
4.5 Coração Isolado	34
4.6 Análise histológica	35
4.6.1 Preparação do Tecido Cardíaco	35
4.6.2 Análise Morfológica do Tecido Cardíaco	36
4.7 Análise Estatística	37
5. RESULTADOS	38
5.1 Massa Corporal e Glicemia	38

5.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca	39
5.2.1 Métodos Lineares.....	41
5.2.2 Métodos Não-Lineares	48
5.3 Sinais eletrocardiográficos	49
5.4 Coração Isolado	50
5.5 Análise Histológica.....	52
5.5.1 Espessura da Parede Ventricular	52
5.5.2 Diâmetro dos Cardiomiócitos	53
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
APÊNDICES	70
ANEXOS.....	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus (DM) está entre as doenças com maior prevalência em todo o mundo, apresentando ainda tendência a um crescente aumento do número de pessoas com esta disfunção. Estima-se que em 2030 o número de pessoas com mais de 64 anos que apresentarão DM será de 82 milhões nos países desenvolvidos e 48 milhões nos países em desenvolvimento prevendo, dessa forma, que o número de pessoas com DM no mundo seja ao menos duplicado (WILD et al., 2004). O DM é uma doença endócrina caracterizada por anormalidades metabólicas diversas, sendo a mais característica a hiperglicemia. No DM são comuns e frequentes complicações, em especial cardiovasculares e neuropáticas, em médio e longo prazo. O DM afetava aproximadamente 171 milhões de pessoas no mundo no ano 2000 segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) e a mortalidade atribuída ao DM no ano 2000 foi de 987.000 mortes. Dados da International Diabetes Federation descreveram que em 2014 a prevalência nacional do diabetes no Brasil era próxima de 8,68% (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

Descrito como um grupo heterogêneo de alterações metabólicas que apresentam em comum a hiperglicemia, o DM pode ser resultado de um defeito na ação da insulina, na secreção da insulina ou em ambos. Concordando com a Sociedade Americana de Diabetes, a Sociedade Brasileira de Diabetes propôs uma classificação dos tipos de diabetes segundo sua etiologia, são elas: (1) diabetes mellitus tipo 1 (DM1), que está presente em 5 a 10% dos casos e é o resultado da destruição das células beta pancreáticas e consequente deficiência de produção de insulina; (2) diabetes mellitus tipo 2 (DM2), que representa 90 a 95% dos casos e é descrito como defeito na ação e secreção da insulina, apresentando uma forma de resistência ao hormônio; (3) outros tipos específicos do diabetes mellitus (doenças do pâncreas exócrino, doenças endócrinas); (4) diabetes mellitus gestacional. Além de outras duas categorias referidas como pré-diabetes, que são a glicemia em

jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída, embora não sejam consideradas como entidades clínicas, se apresentam como fatores de risco para o DM e doenças cardiovasculares. (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2003).

1.2 COMPLICAÇÕES DO DIABETES MELITTUS

Os indivíduos que apresentam o DM têm risco aumentado do desenvolvimento de algumas complicações decorrentes da doença. As complicações frequentes são as doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, doenças renais, neuropatias e complicações gestacionais (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015). O DM apresenta alta taxa de morbidade e mortalidade. Evidencia-se ainda, que as doenças cardiovasculares são as principais causas de morbidade e mortalidade em indivíduos acometidos por DM (DESHPANDE et. al., 2008; DICK, et. al., 1993).

Dentre as complicações mais comuns encontram-se as neuropatias. Estas em longo prazo afetam certa de 50% dos pacientes diabéticos (DICK et. al., 1993; YOUNG et al. 1993). O comprometimento mais comum é a polineuropatia diabética distal sensório-motora (PND); no entanto, lesões difusas e mesmo disfunções nervosas autonômicas podem acometer o paciente diabético (BOULTON et. al., 2004). Dentre as neuropatias autonômicas, a neuropatia autonômica cardíaca (NAC) é uma das mais preocupantes, pois está relacionada à maior risco de desenvolvimento de doenças cardíacas e à mortalidade nesta população (LIAO et. al., 2002; GERRITSEN et. al., 2001).

As neuropatias diabéticas podem ser divididas em duas categorias gerais: as difusas e as focais. As mais comuns são as difusas dentro dessa categoria as mais conhecidas são a PND e a neuropatia autonômica diabética (NAD). Estas são geralmente crônicas e progressivas. O segundo tipo, as focais, são geralmente agudas no início e menos comuns nos pacientes diabéticos (EDWARDS et. al., 2008, FREEMAN, 2005)

A NAD pode estar acompanhada da PND, podendo prejudicar qualquer função do sistema nervoso autônomo, tanto do ramo simpático como parassimpático. No entanto a NAD é uma das complicações do DM menos conhecida e compreendida (FREEMAN, 2005, VINIK, 2004).

A NAC é a mais importante manifestação clínica da NAD devido à sua correlação com a alta taxa de mortalidade, que é estimada em torno de 27% a 56% ao longo de 5 a 10 anos da doença (MASER et al., 2003). Alguns sinais clínicos são indicativos para a presença da NAC como, por exemplo, a taquicardia. Esta acontece pela alteração fisiológica dos componentes do sistema nervoso autônomo (SNA) no coração. Algumas das alterações que podem levar a taquicardia são descritas como: (1) modificação na funcionalidade nos pressorreceptores de pressão arterial, nos quais a hiperglicemia e suas alterações estruturais nessas células tornam os receptores incapazes de responder às alterações de pressão (DALL'AGO et al., 1999); (2) Alteração nos receptores do nó sinusal (HICKS et al., 1998) bem como alterações estruturais das terminações nervosas do nó sinusal, uma possível degeneração das vesículas que acomodam os neurotransmissores adrenérgicos e colinérgicos, deixando a resposta mais acentuada devido à presença elevada de neurotransmissores nas fendas sinápticas (SANYAL et al., 2012). Relacionada com essas alterações que acometem a frequência cardíaca (FC), acontece simultaneamente a perda da capacidade de variação de FC no repouso e alterações na sua resposta mediante ao exercício. Essas alterações são devido à denervação autonômica, tanto de ramos simpáticos como parassimpáticos e são frequentemente encontradas nos pacientes com NAC (VINIK, 2003).

Outra complicação encontrada no DM é a miocardiopatia diabética (MCD), uma doença miocárdica, que pode ser descrita como uma disfunção ventricular que não está relacionada à doença arterial coronariana ou à hipertensão arterial sistêmica, (DUNCAN, 2011; MAYA e VILLARREAL, 2010; BUGGER e ABEL, 2009; KHAVANDI et. al., 2009). Essa patologia que apresenta um dano primário do miocárdio podendo alterar a estrutura e função cardíaca, pode também ser caracterizada por disfunção diastólica, porém esta é mais aparente na presença de hipertensão ou isquemia do miocárdio (RUBLER, et. al. 1972).

A MCD é caracterizada por hipertrofia do cardiomiócito e fibrose miocárdica e em geral, está associada à redução da função mecânica e a mudanças eletrofisiológicas (MAYA e VILLARREAL, 2010; BUGGER e ABEL, 2009). Alterações histopatológicas encontradas no miocárdio na MCD incluem hipertrofia dos cardiomiócitos, fibrose perivascular e intersticial, aumento do estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (DUNCAN, 2011, KHAVANDI et. al., 2009, BUGGER e ABEL, 2009). Já as alterações clínicas da MCD em geral são dadas como disfunção diastólica inicial e hipertrofia, podendo progredir para a insuficiência cardíaca em situações avançadas (MAYA e VILLARREAL, 2010, KHAVANDI et. al., 2009).

1.2.1 PATOGENIA DAS NEUROPATIAS

As síndromes neuropáticas provêm de múltiplas etiologias, mas é claramente observado que a hiperglicemia desempenha um papel chave no desenvolvimento e na progressão da neuropatia diabética, assim como, em algumas complicações microvasculares (EDWARDS, 2008; VINIK, 2007).

A hiperglicemia, glicotoxicidade e sinalização de insulina prejudicada combinados com outros fatores de risco podem ativar vias bioquímicas que afetam o metabolismo celular. Essas alterações podem promover alterações estruturais como desmielinização segmentar, degeneração Waleriana e microangiopatias, e pode ainda induzir apoptose neuronal de gânglios da raiz dorsal resultando em subseqüentes danos que podem levar à perda de fibras nervosas mielínicas e amielínicas e conseqüentemente problemas de condução nervosa (O'BRIEN et.al. 2014; SALEH et.al., 2013; VICENTE et.al.; 2005).

Uma das vias metabólicas mais citadas como envolvida na patogenia da neuropatia diabética é a do polioliol. Nesta via, a glicose penetra dentro dos nervos periféricos em concentração anormalmente alta e é convertida em sorbitol e frutose pela enzima aldose redutase presente no axoplasma, gerando acúmulo de sorbitol e conseqüente redução do mioinositol intracelular. Estas alterações provocam redução do transporte ativo de vários metabólitos. Com

tal mudança, os mecanismos de regulação intracelular vão ser alterados reduzindo a atividade da enzima sódio-potássio-ATPase, que por sua vez, reduz a atividade da bomba Na^+/K^+ , acumulando sódio intracelular e gerando alterações no potencial de membrana. Como resultado dessa via metabólica alterada pela hiperglicemia obtida no DM, ocorre diminuição da velocidade de condução neural (TOMILINSON, 1998; GREENE et.al., 1992).

Outra possibilidade de origem da neuropatia diabética é através dos AGE's (do Inglês, Advanced-glycatione products), que são os produtos da glicação avançada, estes se originam através de uma ligação não-enzimática da glicose com o grupo amina das proteínas formando estruturas denominadas bases de Schiff instáveis. Essas bases sofrem um processo bioquímico, para que se tornem mais estáveis, dando origem a uma nova estrutura denominada produtos de Amadori. A partir desses produtos, se houver manutenção da glicemia elevada, são originados por nova modificação química os AGEs (ANEJA et. al., 2008; BONETTI et.al., 2003; DE CATARINA, 2000). Em indivíduos diabéticos, devido à hiperglicemia, AGEs se formam de maneira acentuada (ANEJA et. al., 2008). Os AGEs podem interferir na patogênese do DM, reagindo com o colágeno da matrix extracelular (MEC) formando uma reação cruzada (cross-linking) de difícil degradação enzimática (ANEJA et. al., 2008). Quando uma reação dessas acontece nos vasos causa dificuldade na difusão através da membrana basal, diminuindo a irrigação e o transporte de nutrientes aos tecidos (BROWNLEE, 2005).

Outra via medida por AGEs é a ligação dos mesmos a receptores específicos na membrana de algumas células como macrófagos, linfócitos ou células endoteliais. Esta ligação aumenta a resposta inflamatória (BONETTI et.al., 2003; LIBBY et.al., 2002; KINLAY et.al., 2001; DE CATARINA, 2000) e o estresse oxidativo celular (BONETTI et.al., 2003; DE CATARINA, 2000). A presença dos AGEs e um aumento acentuado no número de radicais livres pode levar à lesões irreversíveis na parede dos vasos sanguíneos pelo reconhecimento de macrófagos e rápida diapedese (BONETTI et.al., 2003; LIBBY et.al., 2002; KINLAY et.al., 2001; DE CATARINA, 2000).

O sorbitol em excesso no endotélio e o edema por ele gerado podem alterar a produção de prostaciclina e comprometer a difusão de oxigênio (BROWNLEE, 2005). A difusão de oxigênio dificultada, combinada com a

redução do fluxo sanguíneo, por aumento da resistência vascular (CAMERON e COTTER, 1997), podem ser outra forma de patogenia das neuropatias, onde uma isquemia ou hipóxia do nervo originaria neuropatias diabéticas (FREEMAN, 2005; CAMERON e COTTER, 1997).

1.2.2 PATOGENIA DA MIOCARDIOPATIA DIABÉTICA

Nas células miocárdicas normais, a matriz extracelular (MEC) é uma complexa rede de proteínas estruturais em constante modificação composta principalmente pelo colágeno do tipo I e do tipo III, em proporção aproximada de 7:3 (PAPPACHAN et al., 2013; BURLEW e WEBER, 2002). Essa rede complexa fornece uma espécie de suporte de arquitetura para o músculo cardíaco, garantindo alinhamento e suporte para as fibras musculares e a propagação coordenada da força durante os eventos que compõem o ciclo cardíaco (PAUSCHINGER et. al., 1999).

De forma já mencionada anteriormente, o colágeno interage com a glicose em situações de hiperglicemia sustentada, dentro de poucas horas são formadas as bases de Schiff. Durante os dias seguintes, e dentro das próximas semanas, acontece uma reorganização da matriz fibrosa, numa forma de colágenos glicosados mais estável, chamada de produtos de Amadori. Esses produtos de Amadori são sujeitos a mais uma modificação química, esta dá origem aos produtos finais da glicação avançada, os AGEs. No decorrer de semanas a meses, esses AGEs estabelecem ligações irreversíveis entre pontes cruzadas das fibras colágenas (ANEJA et. al., 2008).

Dessa forma, a hiperglicemia, leva ao remodelamento das proteínas estruturais do miocárdio, gerando efeitos diversos nas propriedades do músculo cardíaco. Essas modificações diversas, acentuadas pela deposição de tecido fibroso, podem gerar aumento da rigidez cardíaca, desencadeando disfunção diastólica, bem como, desencadear alterações da condutividade elétrica cardíaca que pode progredir para a disfunção sistólica cardíaca e fração de ejeção reduzida (DUNCAN, 2011; MAYA e VILLARREAL, 2010; BUGGER e ABEL, 2009; ASBUN e VILLARREAL, 2006; BURLEW e WEBER, 2002; ECKARDT et. al., 2000).

1.2 AVALIAÇÃO DA NEUROPATIA AUTONÔMICA CARDÍACA PELA ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) é definida como a quantidade de oscilações dos intervalos entre ciclos cardíacos consecutivos (intervalos RR), relacionadas com a influência do SNA, sobre o coração. A VFC também é uma potente ferramenta na avaliação do SNA na regulação da homeostase do corpo humano, em condições normais ou patológicas (VANDERLEI, 2009).

A VFC resulta da capacidade do coração de responder a diversos estímulos endógenos e exógenos, como por exemplo, atividade física, respiração, estresse, alterações metabólicas e hormonais; bem como, responder aos diversos estresses cardiovasculares consequentes às várias doenças (VANDERLEI, 2009). A VFC serve então como um indicador da capacidade de modulação do SNA sobre o sistema cardiovascular, sendo que, uma alta capacidade de variação da FC, indicam índices de saúde e condicionamento físico elevados. Por consequência, a VFC diminuída é um preditor de alterações na homeostase (PUMPRLA et. al., 2002).

A VFC descreve as oscilações dos intervalos entre ciclos cardíacos consecutivos. Estas oscilações refletem o nível de influência do SNA diretamente sobre o nó sinusal, átrio ventricular e miocárdio atrial, de maneira parassimpática e por todo o miocárdio de forma simpática (além da influência endócrina) (AUBERT et. al., 2003; TASK FORCE, 1996). Estudos prévios (LAROSA et al., 2008; LIMONGELLI et al., 2007; KLEIGER et. al., 1987) relacionaram a diminuição na capacidade de variar da frequência cardíaca, ou uma redução da VFC, como um preditor de mortalidade após infarto agudo do miocárdio, bem como indicativo de outras doenças cardiovasculares. Da mesma forma, Xuan e colaboradores (2015) e Howarth e colaboradores (2005) também observaram que uma diminuição da VFC estava relacionada com a progressão do DM. Dessa forma, a VFC tem sido utilizada como um importante método de avaliação de fenômenos fisiológicos anormais relacionados ao SNA.

A VFC pode ser avaliada através da análise do eletrocardiograma obtido em indivíduos em repouso ou após indução de manobras que exacerbem a

atividade do SNA. O eletrocardiograma (ECG) é um registro gráfico das variações do potencial elétrico das células cardíacas, mede dessa forma, a atividade elétrica do coração. Essas variações da diferença de potencial ao longo do tempo são registradas pela eletrocardiografia, que é um exame padrão para avaliar a geração e propagação da atividade elétrica do coração.(GUS, 2007, BERNE, 2006).

A representação gráfica do ECG, apresenta um traçado que consiste nas ondas P, QRS e T. A onda P representa a distribuição da ativação ou despolarização atrial, o complexo QRS representa a despolarização ventricular e a onda T a repolarização dos ventrículos. Existem alguns intervalos entre essas ondas, como por exemplo, o intervalo PR que representa o tempo entre o início da ativação atrial e início da ativação ventricular, parte desse tempo também envolve a passagem do impulso pelo sistema de condução atrioventricular (BERNE, 2006). O intervalo ST corresponde ao período total de tempo onde os ventrículos estão despolarizados. Já o intervalo QT representa a duração total da atividade elétrica ventricular. Outro componente do ECG é o QTc que nada mais é que o intervalo QT corrigido pela frequência cardíaca através fórmulas matemáticas (GUS, 2007, BERNE, 2006).

O tempo entre duas ondas R em milissegundos é denominado intervalo RR, este é utilizado para medir a variabilidade da VFC, após a construção de uma série temporal de intervalos (tacograma).

Um método baseado nas alterações da frequência cardíaca (FC) e pressão arterial (PA) em resposta a estímulos padronizados é empregado para avaliar a integridade do SNA (EWING et.al., 1985). Esse método é um conjunto de testes, conhecido como bateria de Ewing. São 4 testes, o primeiro de VFC durante a respiração profunda, o segundo de resposta da VFC à manobra de Valsalva, o terceiro de resposta da FC imediata ao levantar, e o teste de pressão arterial ao ortostatismo. Embora tenham muito uso na clínica, métodos alternativos e que podem ser extraídos de outras avaliações (como após o uso da monitoração Holter), como no caso da VFC, tem sido cada vez mais utilizados e aceitos para avaliação do SNA e diagnóstico de NAC.

Existem alguns métodos para análise da VFC através dos registros de ECG obtidos previamente por monitoração a curto ou longo prazo, esses métodos podem ser divididos lineares e não lineares.

1.3.1 MÉTODOS LINEARES

DOMÍNIO DO TEMPO

Os índices do domínio de tempo são denominados dessa forma por expressar os resultados em unidade de tempo (milissegundos). Para isso são utilizados métodos estatísticos ou geométricos (média, desvio padrão e índices derivados do histograma ou do mapa de coordenadas cartesianas dos intervalos RR), calculando-se os índices tradutores de flutuações na duração dos ciclos cardíacos utilizando intervalos RR normais (VANDERLEI, 2009, TASK FORCE, 1996).

Os índices avaliados no domínio tempo são: SDNN, que corresponde ao desvio padrão da média de todos os intervalos RR normais; SDNNi, que é a média dos desvios padrões da média de intervalos RR normais calculados em intervalos de 5 minutos; SDANN, equivalente ao desvio padrão das médias dos intervalos RR calculados em intervalos de 5 minutos; RMSSD, que representa a raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes; pNN50, que é o percentual de intervalos RR normais que diferem mais que 50 milissegundos do seu adjacente e por fim o RR médio que é a média de todos os intervalos RR normais (ROQUE, 2009; VANDERLEI et. al., 2009; TASK FORCE, 1996). Alguns índices como, por exemplo, o SDNN e SDANN, são obtidos de registros de longa duração e apresentam ambas as atividades de SNA, simpática e parassimpática (VFC global), porém não permitem distinção sobre quando as modificações da VFC são devido ao tônus simpático aumentado ou retirada do tônus vagal (NOVAIS et. al., 2004). No entanto os índices RMSSD e pNN50 são descritos como representantes da atividade parassimpática (RIBEIRO e MORAES FILHO, 2005; AUBERT et. al., 2003; PUMPRLA et. al. 2002).

Através de métodos geométricos é possível obter outros índices ainda no domínio de tempo, como o índice triangular, que é um histograma da densidade dos intervalos RR normais. A união dos pontos forma um triângulo e a base desse triângulo (índice triangular) expressa a variabilidade. Este índice tem relação com o desvio padrão da média de todos os intervalos RR

(RIBEIRO e MORAES FILHO, 2005; ROCHA et. al., 2005). Outro método geométrico pode ser obtido pelo plot de Poincaré, que representa uma série temporal dentro de um plano cartesiano, no qual cada intervalo RR é correlacionado com o intervalo antecedente. Através deste obtêm-se três índices: SD1, SD2 e a razão SD1/SD2. (VANDERLEI, 2009, TASK FORCE, 1996). O SD1 representa um registro instantâneo da VFC batimento a batimento, o SD2 representa a VFC em registros de longa duração e a razão SD1/SD2 mostra a relação entre as variações de curta e longa (PASCHOAL et. al., 2003; TASK FORCE, 1996).

DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA

Os métodos no domínio da frequência diferem dos do domínio de tempo por sua capacidade de individualizar e quantificar os diferentes componentes de frequência de uma oscilação complexa. O método mais utilizado desse domínio é o de análise espectral, que no estudo da VFC, usualmente identifica oscilações em três bandas de frequência. (RIBEIRO e MORAES FILHO, 2005). A alta frequência (High Frequency – HF) com variações entre 0,15 a 0,4 Hz no humano e 0,75 a 3 Hz em ratos (DA SILVA et al., 2001), corresponde à modulação parassimpática e está sobre influência respiratória, descritas anteriormente em humanos (RIBEIRO e MORAES FILHO, 2005) e é um indicador de atuação predominante do nervo vago sobre o coração. O componente de baixa frequência (Low Frequency – LF) em torno de 0,04 a 0,15 Hz no humano e 0,20 a 0,75 Hz em ratos, corresponde à ação conjunta dos componentes vagal e simpático sobre o coração com predominância simpática. Há ainda os componentes de muito baixa frequência (Very Low Frequency – VLF) em humanos esse valor é menor que 0,03 Hz e em ratos valores menores que 0,2 Hz. Além de um componente descrito como de ultra baixa frequência (Ultra Low Frequency – ULF). Estes dois últimos são critérios menos utilizados, cuja explicação fisiológica não está muito bem definida (NOVAIS et. al., 2004; GODOY et. al., 2005). No rato a VLF representa componentes de variação mais lenta no sistema, como alterações hormonais, de temperatura ou ainda variações circadianas (MONTANO et al., 1994). A relação LF/HF representa alterações da razão entre os componentes simpático

e parassimpático, demonstrando como está o balanço simpato-vagal no controle cardíaco (NOVAIS et al., 2004).

Esses índices espectrais são então obtidos através de processamento matemáticos, como a utilização da transformada rápida de Fourier (FFT) ou de modelos auto-regressivos. (VANDERLEI, 2009; AUBERT et al., 2003).

1.3.2 MÉTODOS NÃO-LINEARES

A não-linearidade é o comportamento que predomina no ser humano e está presente em todos os sistemas vivos, produzindo comportamentos irregulares. Uma vez ocorrido, dificilmente ocorrerá uma novamente de forma idêntica. Algumas teorias de sistemas não-lineares servem para interpretar, explicar e prever o comportamento de fenômenos biológicos já que esses por sua natureza complexa e dinâmica não seguem um padrão linear (GODOY et al., 2005). É associado à Teoria do Caos, a qual descreve condições que são extremamente sensíveis à condição inicial e dificilmente se repetirão. Também são preditores de mortalidade na prática clínica, como na investigação de doenças cardíacas (GODOY et al., 2005; RIBEIRO e MORAIS, 2005).

Além disso, métodos não-lineares de avaliação da VFC são descritos e têm ganhado interesse nos últimos anos. Um dos exemplos é o cálculo da Entropia aproximadas (ApEn), que é o mais utilizado na prática clínica. (GODOY et al., 2005).

2. JUSTIFICATIVA

A presença de neuropatia autonômica no paciente diabético está associada com maior mortalidade e com a presença de outras complicações como, por exemplo, a neuropatia autonômica cardíaca. Dessa forma, a caracterização das alterações temporais de variabilidade da frequência cardíaca e a investigação de sinais de neuropatia autonômica cardíaca são de extrema importância para o manejo do paciente diabético, sendo estes os objetivos do presente estudo.

Nesse contexto, o entendimento das alterações fisiopatológicas da neuropatia diabética é fundamental para o estudo de futuras opções terapêuticas desenvolvidas especificamente para atenuar ou reverter esta doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a progressão temporal da disfunção autonômica cardíaca, em curto prazo, consequente ao DM experimental induzido por estreptozotocina (STZ).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar as alterações temporais na variabilidade da frequência cardíaca no diabetes mellitus experimental através de monitoramento por eletrocardiografia.

Avaliar os parâmetros eletrocardiográficos de animais controle e diabéticos durante a progressão do DM experimental.

Avaliar a contratilidade cardíaca em corações isolados um mês após a indução do DM.

Avaliar alterações histológicas na morfologia cardíaca após um mês de progressão do DM

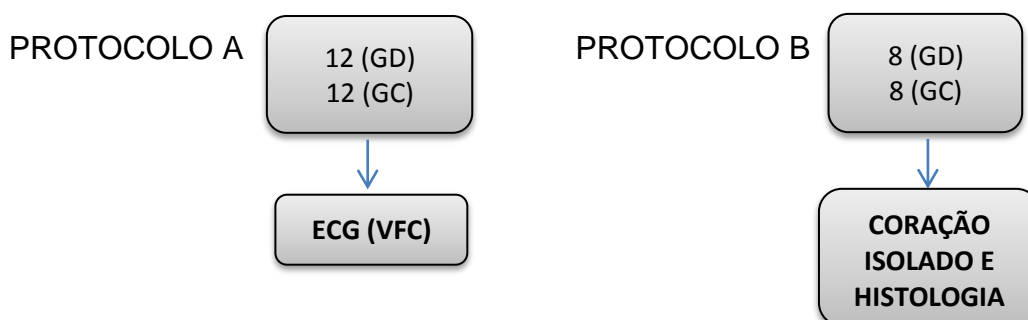
4. METODOLOGIA

4.1 Delineamento experimental

A amostra foi composta por 40 ratos machos da raça Wistar, de cerca de 90 dias de vida, com massa corporal aproximada entre 250-300 gramas, fornecidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, campus Centro Politécnico. Estes foram alojados e mantidos no biotério do setor de ciências biológicas da UFPR e no laboratório de contração muscular, no departamento de fisiologia da UFPR, ambos no campus centro politécnico, em caixas com livre acesso a ração e água, em temperatura mantida entre 18°C e 22°C em um ciclo claro-escuro de 12 horas. Todo o presente estudo foi realizado conforme as diretrizes do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná (CEUA-UFPR), sob o protocolo de número 816/14.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: Grupo controle (GC) e um grupo experimental diabético (GD). Todos os animais foram submetidos à cirurgia de implantação de eletrodos para aquisição dos sinais elétricos cardíacos.

Aleatoriamente os animais foram divididos novamente em duas populações, uma delas denominada de protocolo A, foi composta por 24 animais destes, 12 (GD) passaram por indução de DM através de STZ e os demais (GC) tiveram apenas injeção de veículo. Esse grupo foi utilizado para registros dos sinais elétricos cardíacos.



Outra população de animais descrito como protocolo B, composto por 16 animais foi utilizado para experimento da função cardíaca através da técnica de coração isolado e posteriormente análise histológica, tendo 8 animais desse grupo (GD) o DM induzido por STZ e 8 (GC) passando apenas pela injeção de veículo servindo de controles (metodologia descrita posteriormente).

4.2 Cirurgia de implantação de eletrodos

Foram implantados eletrodos de fio de aço inox, de maneira que as derivações I e II de um ECG convencional puderam ser avaliadas.

No primeiro momento foi realizada a implantação de quatro eletrodos de ECG (fio de aço inox, espessura de 0,5mm) subcutaneamente (atrás de cada pata – Figura 1) em todos os animais do protocolo A. Através de uma agulha guia (16G) o fio foi guiado abaixo da pele e fixado num formato de um nó entrelaçado (FIGURA 1). Para cirurgia os animais foram anestesiados com 50mg/Kg de cetamina e 10mg/Kg de xilazina (com aumento de 10% da dose durante o procedimento baseado na resposta reflexa ao pinçamento das patas traseiras).

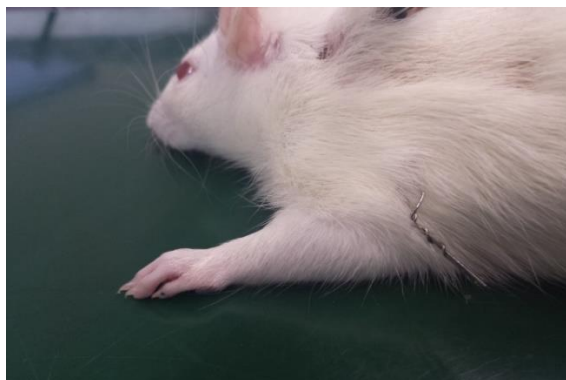


Figura 1: Eletrodo tipo clip subcutâneo
Fonte: Laboratório de Fisiologia da Contração Muscular

Após o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos em gaiolas individuais para recuperação e para monitoramento do sinal eletrocardiográfico. Durante o monitoramento e captura dos sinais eletrocardiográficos, os cabos foram exteriorizados de maneira a permitir livre movimentação do animal sem

interferência dos cabos, sem restrição. O monitoramento foi realizado durante 1 hora no período matutino.

4.3 Indução do diabetes por estreptozocina

Dois dias após a cirurgia de implantação de eletrodos, o DM foi induzido por dose única intravenosa (veia peniana) de STZ (45mg/kg) dissolvido em 0,01M de tampão citrato, pH 4, sob jejum prévio de 14 horas e após protocolo anestésico de cetamina 50mg/kg e xilazina 10mg/kg. No GC, foi injetado apenas o tampão citrato. A glicemia foi mensurada primeiramente em estado pré-indução, sete dias após a intervenção e repetidamente durante todo o estudo com um intervalo semanal através de um glicosímetro Accutrend da marca Roche, utilizando amostras obtidas através de uma gota sanguínea retiradas da veia caudal do animal. Considerou-se níveis glicêmicos maiores que 200 mg/dL, na primeira semana, como diagnóstico positivo para o diabetes experimental.

4.4 Mensuração dos sinais eletrocardiográficos e variabilidade da frequência cardíaca

A avaliação dos sinais eletrocardiográficos e da VFC ocorreu desde a indução do DM até o 26º dia pós-indução. As medidas foram realizadas nas primeiras 48 horas e posteriormente a cada três dias, durante 1 hora/dia sempre no período matutino. Os animais eram mantidos com movimentação livre dentro de caixas individuais em ambiente climatizado e reservado, procurando atenuar barulhos e a presença de trânsito de pessoas de modo a evitar interferências na aquisição da VFC. Os cabos de conexão do aparelho receptor do sinal (Power Lab) foram acoplados sobre a estrutura externa dos eletrodos colocados previamente por implantação subcutânea. As informações elétricas captadas foram processadas através do programa LabChart 7.0, no módulo ECG, em todas as derivações do plano frontal.

Para análise dos sinais de ECG foi utilizado o software LabChart 7.0 e Kubius HRV (versão 2.0 MATLAB, MathWorks Inc., Kuopio, Finland). Foram mensurados os intervalos P-Q, QRS, QT e calculado o QTc. Os intervalos R-R (N-N) foram mensurados e as medidas de VFC tanto do domínio tempo quanto do domínio frequência foram calculadas. Para o domínio tempo foram analisados: o desvio padrão da média dos intervalos R-R (SDNN); a raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes (rMSSD). Para o domínio frequência, foi utilizada a transformada Rápida de Fourier (FFT), para analisarmos os seguintes parâmetros: baixa frequência - low frequency (LF) (0,20 a 0,75 Hz), alta frequência - high frequency (HF) (0,75 a 3 Hz); e a razão LF/HF. Para a análise não linear foram analisadas as variáveis: SD1, SD2 e Entropia de Shannon (TASK FORCE, 1996).

4.5 Coração Isolado

Os animais foram anestesiados e heparinizados (1 ml de uma solução 1%) e após a constatação de ausência de estímulos dolorosos, os animais foram exsanguinados e a toracotomia realizada para remoção do coração.

O coração removido foi retrogradamente perfundido através de uma cânula fixada no coto aórtico, com solução de Ringer modificada (110mM NaCl; 4mM KCl; 1,5mM CaCl₂; 2mM MgCl₂; 10mM Tris [pH: 7,4]; 11mM Glicose) e continuamente oxigenada e mantida à 37° C. A pressão de perfusão foi mantida constante (60mmHg). O coração foi mantido imerso em solução de Ringer de idêntica composição. Foi realizada uma abertura na junção átrio ventricular esquerda para permitir a inserção de um balão na cavidade ventricular esquerda. Este balão foi fixado à extremidade de uma sonda uretral nº4 (Mark Med) e esta conectada a um transdutor de pressão (AD Instruments – MLT1010/D). O balão foi somente preenchido com água com uso de uma seringa de capacidade de 1000 µl, após ter sido cuidadosamente posicionado na cavidade ventricular esquerda. O transdutor de pressão foi conectado a uma unidade de aquisição de sinais (PowerLab 4/30, AD Instrument) e os dados foram armazenados e analisados em um computador, utilizando-se um

software Lab Chart versão 7.3.7 (ADInstruments). Foi registrado a oscilação de pressão intraventricular esquerda e posteriormente mensurada a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) e calculado os valores que representam a aceleração de desenvolvimento de pressão do VE representado pelo dP/dt_{max} e a taxa de relaxamento representada pela derivada mínima de pressão pelo tempo, dP/dt_{min} . O enchimento do balão foi realizado de maneira gradual até obtenção do valor máximo na relação volume/pressão gerada pela contração miocárdica ou aumento máximo da pressão diastólica de 10mmHg. Foi realizada, antes de cada experimento, a curva de calibração do transdutor de pressão mediante o emprego de um manômetro de mercúrio (DIAS et. al., 2006).

O registro eletrocardiográfico no coração isolado foi obtido empregando-se a unidade Power Lab 26T conectado a um computador no módulo de ECG e com o uso do software Cardio Axis. O registro foi realizado utilizando três eletrodos mergulhados na solução de banho e posicionados lateralmente às preparações, para obtenção de derivações não convencionais. Esses eletrodos foram mantidos em posição estacionária e em todos os experimentos os corações foram montados sempre na mesma posição anatômica. Desta maneira, foi possível a obtenção do registro eletrocardiográfico em duas derivações com um ângulo entre as mesmas de aproximadamente 60° . A mensuração de pressão intraventricular e o registro eletrocardiográfico foram obtidos simultaneamente.

Ao final do experimento os corações foram fixados em formol 10%, progressivamente desidratados em álcool e emblocados em parafina para análise histológica descrita posteriormente.

4.6 Análise histológica

4.6.1 Preparação do Tecido Cardíaco

Os corações ainda canulados após a técnica já descrita de coração isolado, foram perfundidos com Formol à 10%. Após perfusão as amostras

foram fixadas por 24 horas na mesma solução sendo mantidas à 4°C. Cada coração foi transversalmente seccionado ao nível ventricular em quatro partes equidistantes (iniciando-se como referência no ápice – corte A), resultando em duas porções médio-basais (cortes C e D) e duas médio-apical (cortes A e B). Os cortes foram então desidratados, diafanizados e incluídos em parafina para formação de blocos. A partir de cada amostra originaram-se três secções em micrótomo, conforme plano de secção previamente descrito.

Para avaliação das secções foi utilizado o protocolo padrão de coloração Hematoxilina-eosina (HE), para análise do trofismo ventricular esquerdo.

As fotografias das lâminas histológicas foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná por um avaliador capacitado. Para a visualização em luz convencional utilizou-se um microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE), equipado com o software Metafer 4 de captura automatizada (Metasystems, Altussheim, DE) Modelo da câmera: CoolCube 1- Metasystems. As análises morfométricas foram realizadas pelo mesmo examinador através do programa ImageJ 1.46.

4.6.2 Análise Morfológica do Tecido Cardíaco

Foi avaliado o trofismo de ventrículo esquerdo através das medidas de espessura da parede ventricular e diâmetro dos cardiomiócitos conforme adaptações dos métodos descritos por Rizzi et al., 2013 e Bilim et al., 2008. A espessura equatorial da parede do ventrículo esquerdo (VE) foi determinada em ampliação microscópica de 20 vezes (objetiva de 2x), utilizando-se as três secções histológicas de cada coração: anterolateral, septal e posterolateral, através da média entre as três mensurações distintas e equidistantes em cada coração, semelhante a mensuração segundo Da Silva, 2014. Medidas de diâmetro dos cardiomiócitos foram realizadas em ampliação de 400 vezes, com um total de 90 células por coração. Em cada uma das secções mencionadas anteriormente foram analisados três campos de observação, num total de nove campos para melhor representar a seção ventricular. Para cada campo analisado, foi mensurado o diâmetro de 10 miócitos. O diâmetro foi obtido ao

nível nuclear de miócitos orientados longitudinalmente, cujo núcleo se apresentava centralizado, com envoltório completo e bem definido.

4.7 Análise Estatística

Os dados estão representados em média \pm erro padrão da média (SEM) à menos que descrito de outra maneira na legenda dos gráficos e figuras. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. A comparação da média dos dados antropométricos e glicemia nos diferentes pontos avaliados (semanalmente) foi avaliada pelo teste ANOVA de dois fatores e medidas repetidas com pós teste de Bonferroni. Para análise estatística das alterações temporais de VFC foi calculada e analisada a integral da variável (por exemplo, SDNN, sRMSSD, etc) dos tempos 0 a 26 dias. Posteriormente, confirmando a linearidade da representação gráfica da integral foi realizada a regressão linear e comparação da inclinação das retas entre os grupos (controle vs. DM). O valor de $p < 0,05$ foi usado como critério de significância.

5. RESULTADOS

5.1 Massa Corporal e Glicemia

Na figura 2 são apresentados os dados de massa corporal e níveis glicêmicos dos animais. A massa corporal dos animais em ambos os grupos foram homogêneos antes da indução experimental de DM. Após sete, quatorze e vinte e seis dias da indução do diabetes ou injeção de veículo, houve no GC, ganho de massa em todos os períodos avaliados. Já no GD, houve redução do massa quando comparado ao GC ($p = 0,0001$) em todos os momentos avaliados após a indução do DM.

Em relação a massa corporal, no GD houve diferença significativa comparando o momento basal com o sétimo, décimo quarto e vigésimo sexto dia ($p = 0,0001$), mas não houve diferença entre o sétimo com o décimo quarto e vigésimo sexto dia, nem quando comparado o décimo quarto com o vigésimo sexto.

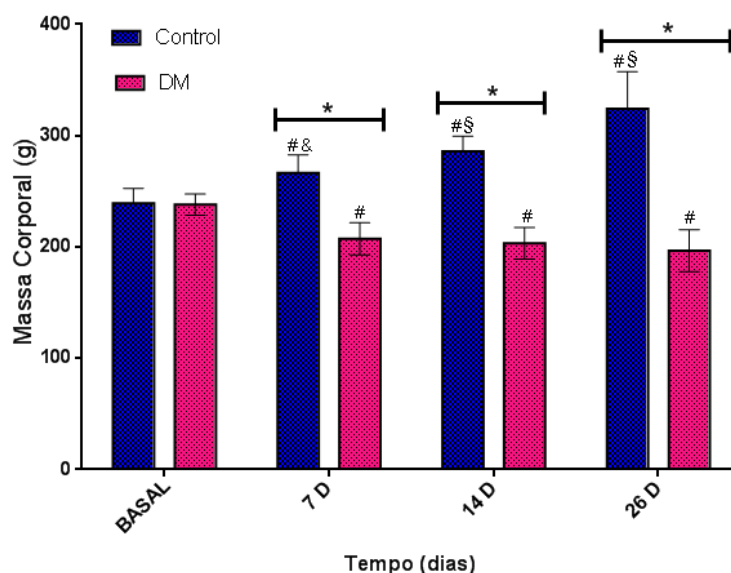


FIGURA 2: Massa corporal na progressão do DM. Média e desvio padrão. * Indica $P < 0,05$ na comparação entre Controle vs. DM ; # Indica $P < 0,05$ na comparação intragrupo com os valores basais; § Indica $P < 0,05$ na comparação intragrupo com valores obtidos aos 7 dias. (N= 20 animais controle e 20 diabéticos).

A comprovação do estado diabético dos animais foi caracterizada por severa hiperglicemia ($p < 0,05$) quando comparada com o estado inicial dos valores da glicemia (FIGURA 3). Foram feitas medidas no estado pré-indução,

aos sete, quatorze e vinte e seis dias pós-indução de STZ e observou-se níveis glicêmicos maiores no GD logo após os sete primeiros dias, persistindo até o vigésimo sexto dia quando comparado com o GC ($p < 0,0001$).

Comparando os valores de glicemia dentro do mesmo grupo, não houve diferença estatística em nenhum dos quatro momentos no GC. No GD houve diferença estatística quando comparado o momento pré-indução com o sétimo, décimo quarto e vigésimo sexto dia pós-indução, ocorrendo um crescente aumento dos níveis glicêmicos até o vigésimo sexto dia.

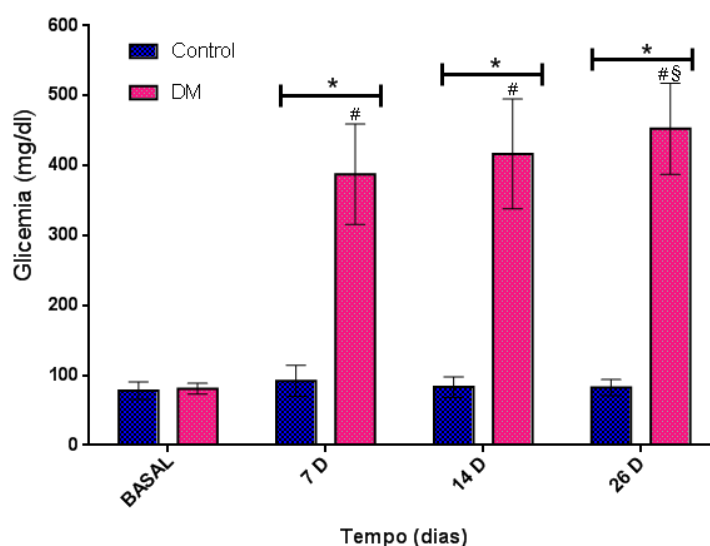


FIGURA 3: Glicemia sanguínea na progressão do DM. Média e desvio padrão. * Indica $P < 0,05$ na comparação entre Controle vs. DM; # Indica $P < 0,05$ na comparação intragrupo em relação aos valores basais; § Indica $P < 0,05$ na comparação intragrupo em relação aos valores obtidos aos 7 dias. (N=20 animais diabéticos e 20 controles).

5.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca

Frequência Cardíaca

A FC dos animais foi mensurada através da coleta dos dados eletrocardiográficos. A progressão temporal, demonstra diminuição da frequência cardíaca ao longo dos dias no GD quando comparada ao GC que manteve estabilidade dos valores após um aumento inicial. O número de animais utilizado para toda a análise de VFC foi de 12 animais por grupo.

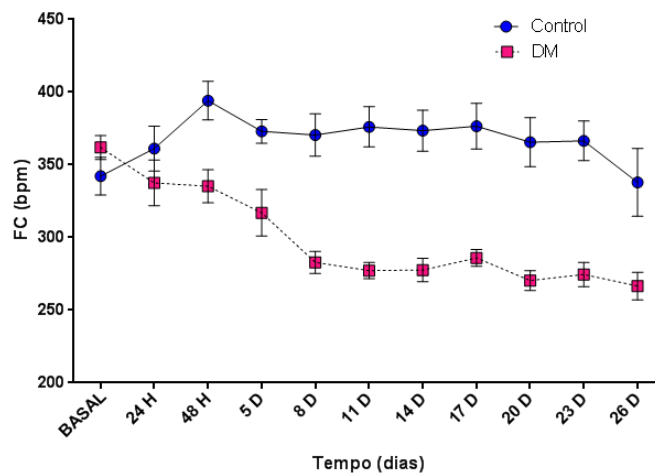


FIGURA 4: Progressão temporal das alterações da frequência cardíaca após indução do DM.

Os valores de FC foram submetidos ao cálculo da integral do dia 0 ao dia 26, para avaliação das alterações da progressão temporal da FC. Posteriormente foi realizada a regressão linear dos valores das integrais (GC - $Y=372,5X + 4,963$, $R^2=0,9999$; GD - $Y=288,9X + 136,5$, $R^2=0,9990$) e comparação da inclinação da reta resultante (os mesmos procedimentos de análise foram realizados para as outras variáveis de VFC como será descrito adiante). Houve diferença significativa da inclinação das retas (*slopes*) comparando os grupos ($p < 0,0001$, FIGURA 5) demonstrando valores menores de FC no grupo DM.

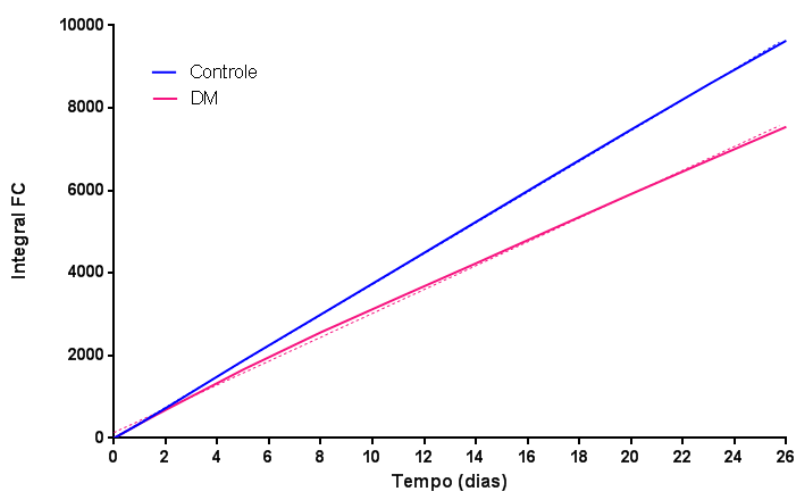


FIGURA 5: Progressão temporal das alterações da FC após indução do DM através da análise da integral da FC do dia 0 ao dia 26. Linhas contínuas representam a integral calculada e linhas pontilhadas a regressão linear.

5.2.1 Métodos Lineares

DOMÍNIO DE TEMPO

A progressão de SDNN está apresentada na figura 6. Visualmente, parece haver um aumento transitório em 48 horas, anterior a diminuição da variabilidade global representada pelo SDNN próximo ao dia 8 no GD que se segue ao dos 26 dias.

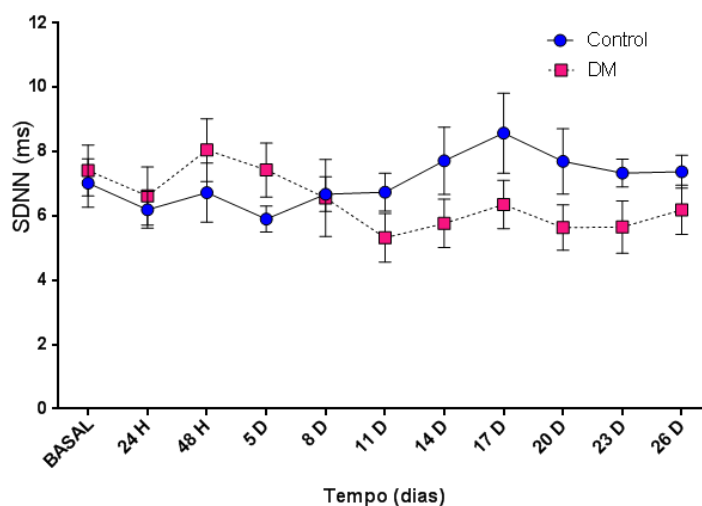


FIGURA 6: Progressão temporal das alterações do índice SDNN no DM. Os dados representam o índice SDNN dos grupos controle e diabético.

Fazendo-se a análise do cálculo da integral (FIGURA 7) e observa-se um aumento transitório da VFC seguido de inversão deste padrão aos 14 dias. Na análise, a tendência de VFC global é de diminuição progressiva no grupo diabético quando comparam-se as inclinações das retas ($p < 0,0001$) obtidas pela regressão linear (GC, $Y=7.167X - 3.175$, $R^2=0,9979$; GC, $Y=6.277X + 3.660$, $R^2=0,9975$).

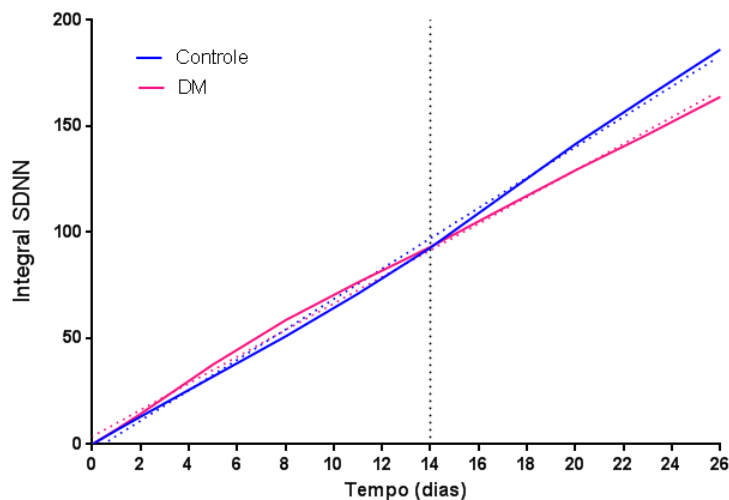


FIGURA 7: Progressão temporal das alterações do índice SDNN no DM através da análise da integral da FC do dia 0 ao dia 26. Linhas contínuas representam a integral calculada e linhas pontilhadas a regressão linear. Linha pontilhada vertical representa o momento aproximado da inversão das retas.

Quando observado a progressão do índice rMSSD (FIGURA 8) também no domínio de tempo, percebe-se que não houve diferença estatística entre os grupos GC e GD durante os 26 dias observados.

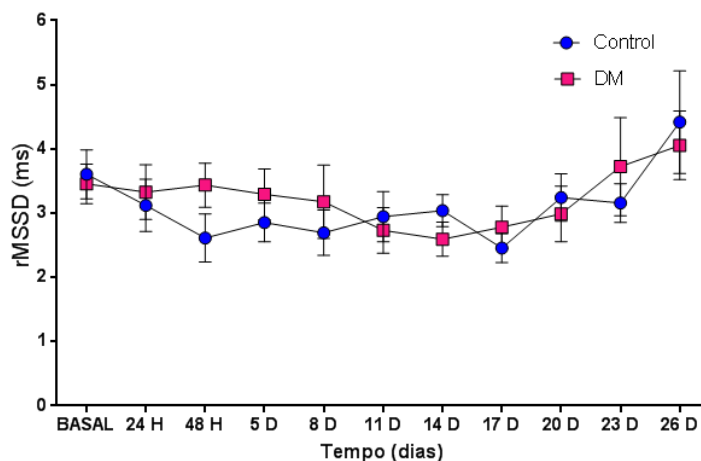


FIGURA 8: Progressão temporal das alterações do índice rMSSD no DM. Os dados representam o índice rMSSD dos grupos controle e diabético.

Esse mesmo índice analisado através do cálculo da integral, pode-se observar que os slopes são diferentes nos dois grupos (FIGURA 9). Apresentando entre as duas retas uma diferença na inclinação ($p = 0,02193$), embora apresentem o mesmo comportamento nos dois grupos. Obtidas

através de regressão linear (GC $Y = 2,917 \cdot X - 0,2146$, $R^2 = 0,9987$; GD $Y = 3,052 \cdot X + 0,7872$, $R^2 = 0,9984$).

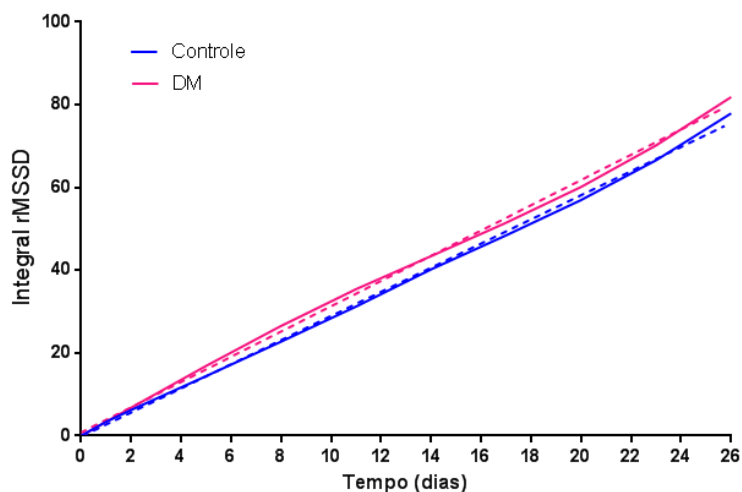


FIGURA 9: Progressão temporal das alterações do índice rMSSD no DM através da análise da integral da FC do dia 0 ao dia 26. Linhas contínuas representam a integral calculada e linhas pontilhadas a regressão linear.

DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA

Dentro do método domínio da frequência, quando observado o índice LF/HF que corresponde ao balanço simpato-vagal pode-se observar na progressão dos pontos ao longo dos 26 dias, existe um aumento inicial nas primeiras 48 horas no GD que em seguida cai e permanece por todo o restante do tempo inferior ao GC.

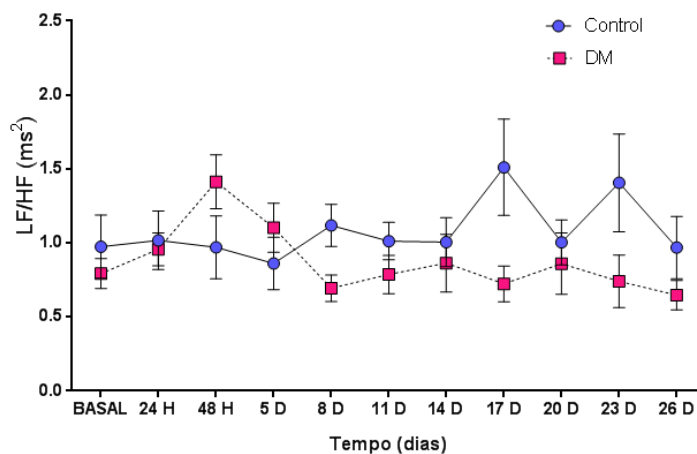


FIGURA 10: Progressão temporal das alterações da razão LF/HF no DM. Os dados representam o índice LF/HF dos grupos controle e diabético.

A análise dos valores do índice LF/HF são observados de forma mais precisa quando a integral é calculada (FIGURA 11), onde se apresenta um aumento da inclinação transitória de LF/HF, que é revertido para uma diminuição posterior, por volta do décimo dia, nos animais diabéticos em comparação aos animais controle. É observado uma diferença significativa na inclinação das retas ($p = 0,0001$), obtidas através de regressão linear (GC $Y = 1,097 * X - 0,5586$, $R^2 = 0,9972$; GD $Y = 0,8637 * X + 0,7256$, $R^2 = 0,9942$).

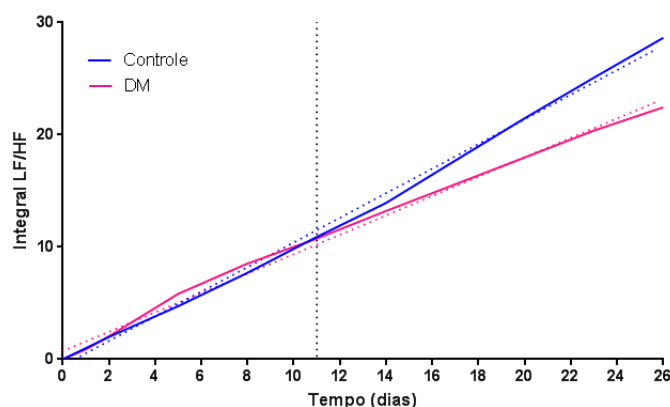


FIGURA 11: Progressão temporal das alterações da razão LF/HF no DM através da análise da integral da FC do dia 0 ao dia 26. Linhas contínuas representam a integral calculada e linhas pontilhadas a regressão linear

O índice LF quando analisado na sua progressão através do tempo observa-se que no GD há um aumento do LF nas 48 horas iniciais quando comparada ao GC, porém a partir do oitavo dia há uma inversão e diminuição no GD e aumento no GC (FIGURA 12).

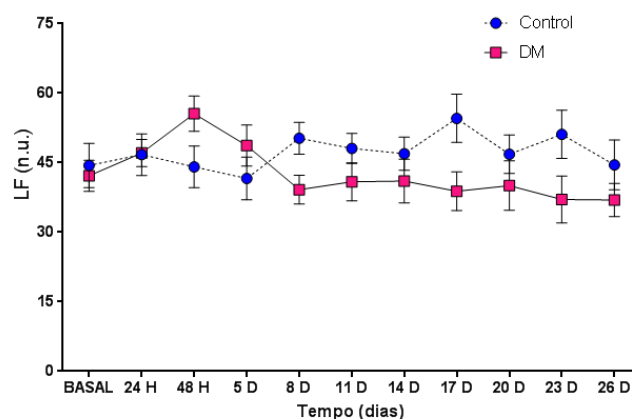


FIGURA 12: Progressão temporal das alterações do índice LF no DM. Os dados representam o índice LF dos grupos controle e diabético.

A figura 13 representa a análise da integral onde se observa que inicialmente nos 10 primeiros dias há um predomínio maior do valor de LF no GD quando comparado ao GC. Esse padrão se inverte por volta do décimo segundo dia, onde há uma diminuição da inclinação da reta de GD quando comparada ao GC. As retas apresentaram inclinações diferentes ($p = 0,0001$), obtidas através de regressão linear (GC $Y = 47,95 * X - 11,86$, $R^2 = 0,9995$; GD $Y = 42,07 * X + 22,93$, $R^2 = 0,997$).

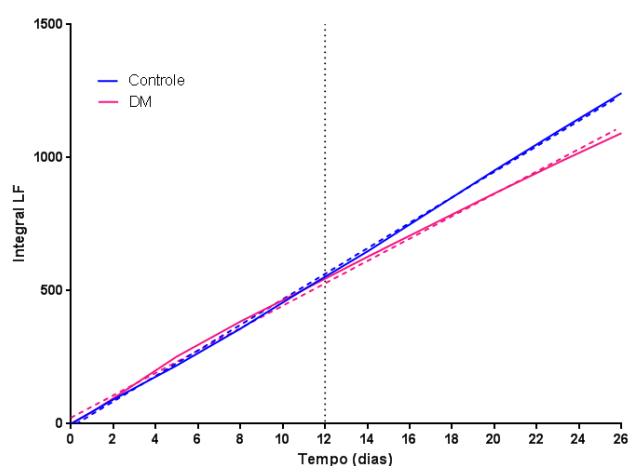


FIGURA 13: Progressão temporal das alterações do índice LF no DM através da análise da integral da FC do dia 0 ao dia 26. Linhas contínuas representam a integral calculada e linhas pontilhadas a regressão linear.

Outro índice ainda do domínio da frequência analisado foi o HF (FIGURA 14), neste, existe inversamente proporcional ao índice LF uma tendência de diminuição do HF nas primeiras 48 horas no GD em relação ao GC, e por volta do oitavo dia existe uma inversão onde há um aumento do HF no GD quando comparado ao GC.

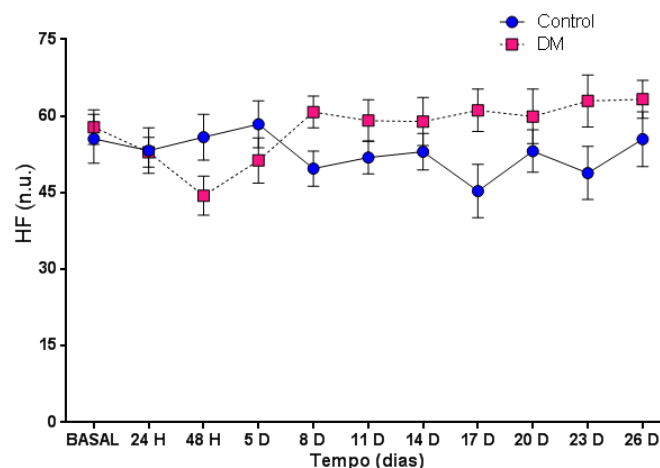


FIGURA 14: Progressão temporal das alterações do índice HF no DM. Os dados representam o índice HF dos grupos controle e diabético.

A análise do cálculo da integral do índice HF demonstra aumento inicial que se inverte aproximadamente no 14º dia (FIGURA 15). Observa-se diferença estatística na inclinação das retas ($p= 0,0025$), obtidas por regressão linear (GC $Y= 3.650 \cdot X + 0,2848$, $R^2= 0,9986$; GD $Y= 3,158 \cdot X + 4,963$, $R^2= 0,9842$) demonstrando a tendência à diminuição nos valores de HF até o 26º dia.

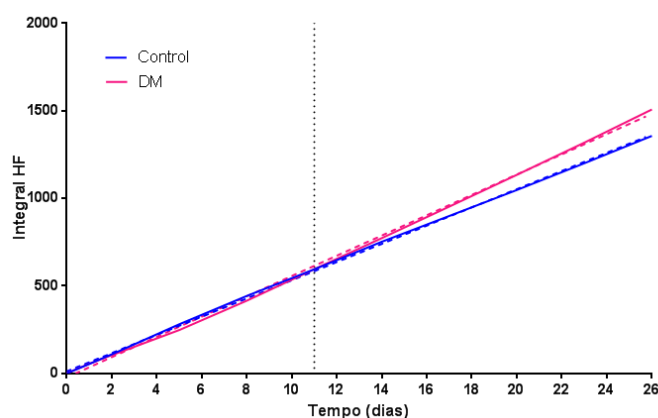


FIGURA 15: Progressão temporal das alterações do índice HF no DM através da análise da integral da FC do dia 0 ao dia 26. Linhas contínuas representam a integral calculada e linhas pontilhadas a regressão linear.

Quanto ao índice SD1 não foi encontrada diferença estatisticamente significativa durante progressão do DM ao longo dos 26 dias (FIGURA 16).

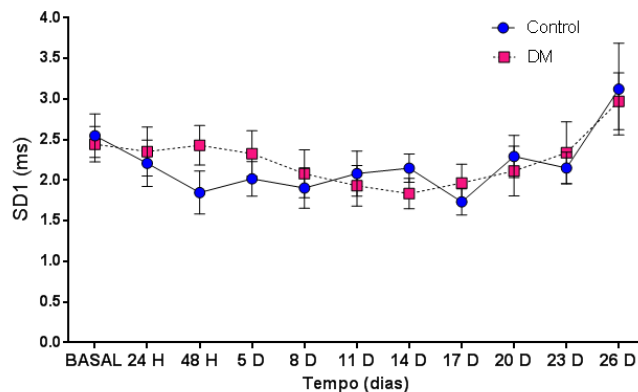


FIGURA 16: Progressão temporal das alterações do índice SD1 no DM. Os dados representam o índice SD1 dos grupos controle e diabético.

A inclinação das retas para SD1 não apresenta resultado significativo ($p= 0,1054$), obtida através de regressão linear (GC $Y= 2,057 \cdot X - 0,1142$, $R^2= 0,9989$; GD $0,9986 Y= 2,116 \cdot X + 0,6446$, $R^2= 0,9986$).

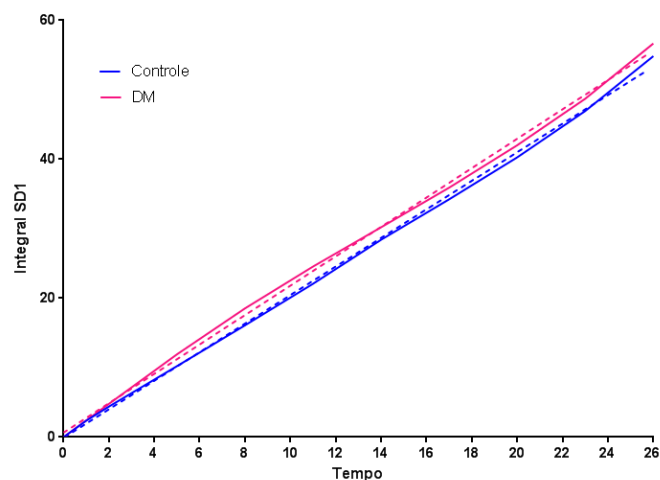


FIGURA 17: Progressão temporal das alterações do índice SD1 no DM através da análise da integral da FC do dia 0 ao dia 26. Linhas contínuas representam a integral calculada e linhas pontilhadas a regressão linear.

Contrariamente, no índice SD2 pode-se observar nas 48 horas iniciais um aumento desse valor nos animais diabéticos, no entanto, da mesma forma que em outro índice de variabilidade global (SDNN), há uma inversão nos valores próximo ao oitavo dia, onde ocorre uma redução desse índice nos animais diabéticos quando comparado aos controles (FIGURA 18).

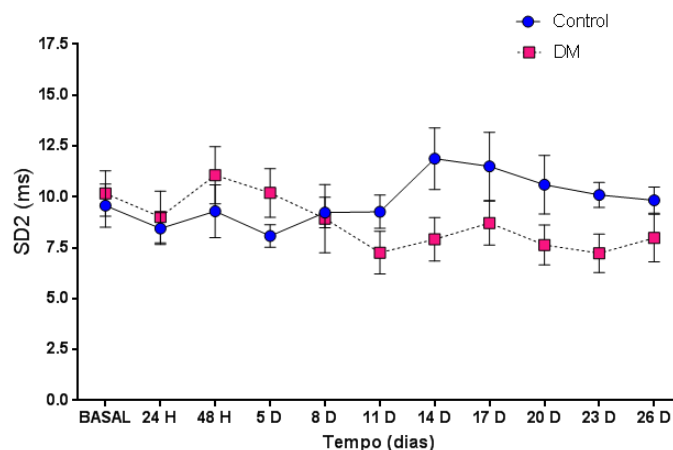


FIGURA 18: Progressão temporal das alterações do índice SD2 no DM. Os dados representam o índice SD2 dos grupos controle e diabético.

Os dados de SD2 passaram pelo cálculo da integral (FIGURA 19), onde se observou um padrão maior no GD durante as duas primeiras semanas, seguido por uma inversão, queda e diminuição significativa desse comportamento no GD quando comparado ao GC. A inclinação das retas foi diferente entre os grupos (GC $Y = 10,00 \cdot X - 4,809$, $R^2 = 0,9977$; GD $Y = 8,534 \cdot X + 5,351$, $R^2 = 0,9970$, $p < 0,001$).

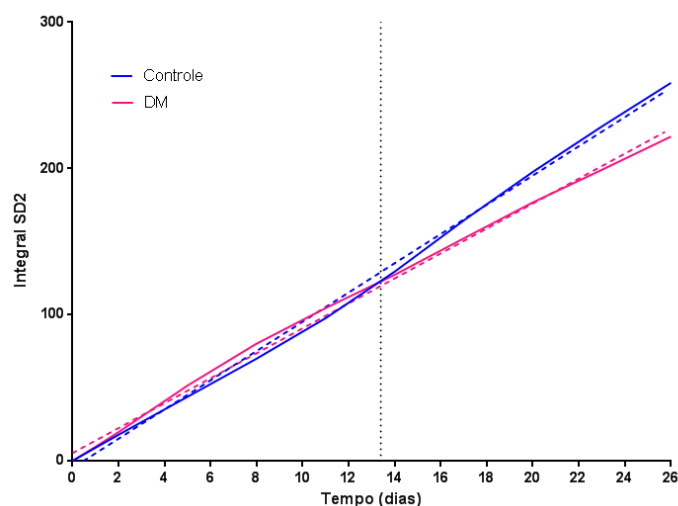


FIGURA 19: Progressão temporal das alterações do índice SD2 no DM através da análise da integral da FC do dia 0 ao dia 26. Linhas contínuas representam a integral calculada e linhas pontilhadas a regressão linear.

5.2.2 Métodos Não-Lineares

O índice analisado dentro dos métodos não lineares é a entropia de Shannon, esta não apresentou diferença entre os grupos na progressão do DM (FIGURA 20).

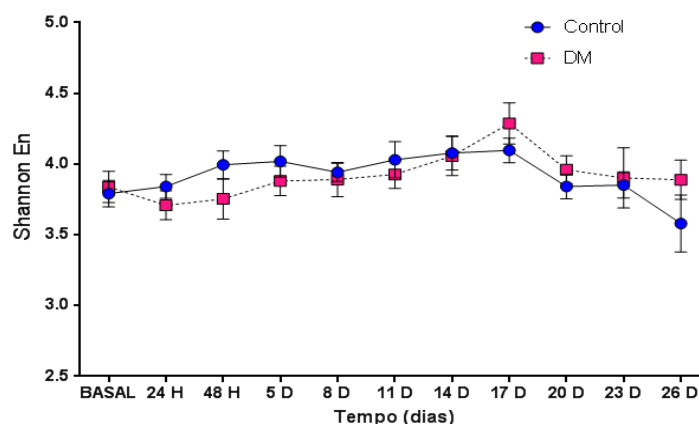


FIGURA 20: Progressão temporal das alterações do índice Entropia de Shannon no DM. Os dados representam o índice Entropia de Shannon dos grupos controle e diabético.

A figura 21 representa a integral calculada e a regressão linear. Observa-se que não houve diferenças na inclinação das retas entre grupos (GC $Y = 3,979 \cdot X - 0,05696$, $R^2 = 0,9999$; GD $Y = 3,966 \cdot X - 0,5960$, $R^2 = 0,9998$, $p = 0,5394$).

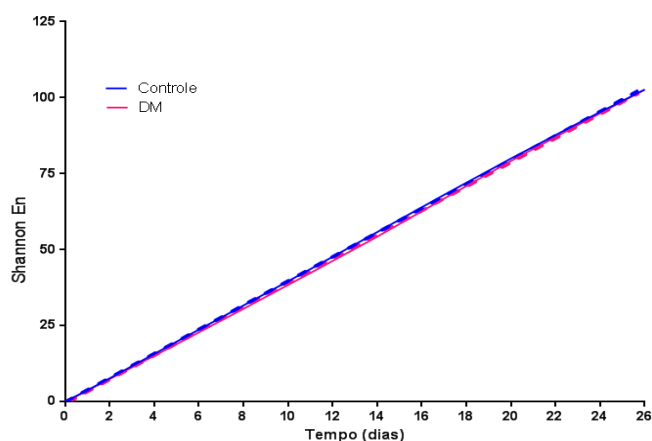


FIGURA 21: Progressão temporal das alterações do índice Entropia de Shannon no DM através da análise da integral da FC do dia 0 ao dia 26. Linhas contínuas representam a integral calculada e linhas pontilhadas a regressão linear.

5.3 Sinais eletrocardiográficos

Os valores dos dados de eletrocardiografia dos animais (sem anestesia $n = 24$) são apresentados na tabela 1. No intervalo PR não houve diferença estatística entre os grupos no instante pré-indução, nem no instante pós-indução. Da mesma forma, outras variáveis analisadas, como duração do intervalo QRS e o cálculo do QTc, não foram diferentes entre os grupos, tanto no momento anterior, quanto 1 mês após a indução do DM.

TABELA 1: DADOS ELETROCARDIOGRÁFICOS NOS MOMENTOS PRÉ E PÓS-INDUÇÃO DO DM OU TAMPÃO VEÍCULO.

	PRÉ			PÓS		
	Controle	DM	P	Controle	DM	p
Intervalo PR	0,044 ±0,001	0,0465 ±0,003	0,052	0,0463 ±0,003	0,047 ±0,004	0,407
Intervalo QRS	0,015 ±0,001	0,015 ±0,001	0,594	0,016 ±0,001	0,015 ±0,001	0,119
QTc	0,139 ±0,020	0,143 ±0,021	0,598	0,134 ±0,024	0,145 ±0,015	0,216

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 24$).

5.4 Coração Isolado

Os valores de pressão intraventricular máxima desenvolvida normalizados pela frequência cardíaca (expressa em Hertz), expressos em mmHg x Hz dos corações isolados foram de $176,9 \pm 42,19$ no grupo controle ($N=8$) e de $146,0 \pm 37,05$ no grupo diabético ($N=8$).

A figura 22A mostra os efeitos do DM sobre a geração de pressão desenvolvida pelos corações isolados, os valores obtidos do teste t não apresentaram diferença significativa quando comparados entre os dois grupos ($p = 0,1428$). A figura 22B representa os efeitos do DM sobre a FC intrínseca dos corações isolados. No entanto, essa variável apresenta diferença

significativa entre os grupos ($p = 0.0093$), obteve-se diminuição dos valores de FC no grupo diabético.

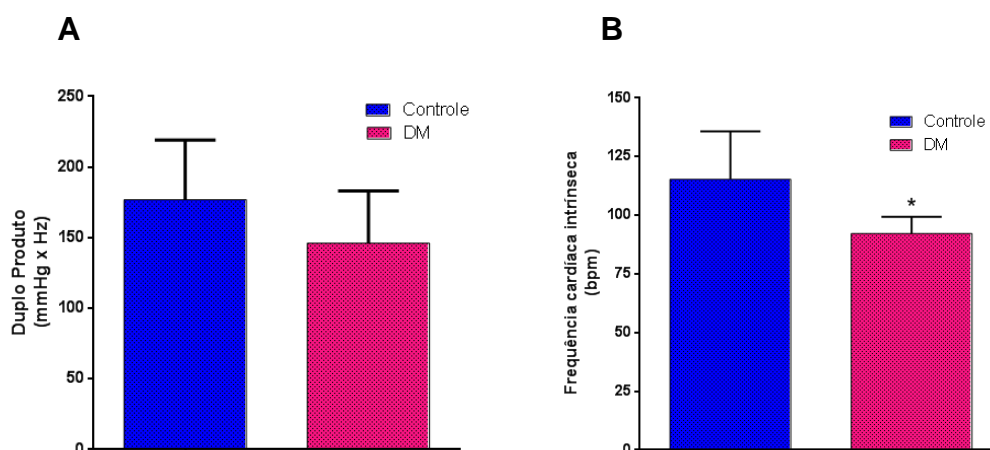


FIGURA 22: Efeito do DM na pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo de ratos. Média e desvio padrão. **A:** Pressão desenvolvida. **B:** FC intrínseca. * Indica $P < 0,05$ na comparação entre Controle vs. DM.

Os valores de $dp/dt_{máx}$ e $dp/dt_{mín}$ em mmHg/seg obtidos dos experimentos com corações isolados normalizados pela pressão desenvolvida, foram respectivamente de $13,95 \pm 2,616$ mmHg x Hz e; $-9,691 \pm 2,160$ mmHg x Hz no grupo controle (N=8) e $12,38 \pm 2,010$ mmHg/s e; $-7,946 \pm 0,8496$ mmHg/s no grupo diabético (N=8), a normalização dos valores de pressão foi realizada porque não houve clampeamento da FC dos corações isolados.

A figura 23 mostra os efeitos do DM na velocidade máxima de geração de pressão intraventricular ($dP/dt_{Máx}$) e na velocidade máxima de relaxamento ($dP/dt_{Mín}$) em corações isolados de ratos. Através do teste t não pareado foi possível observar que não houve diferença estatística em nenhum dos momentos. Porém na $dP/dt_{mín}$ o valor de p foi igual a 0,051 apresentando uma clara tendência de diferença entre os grupos, embora não seja considerado estatisticamente significativo.

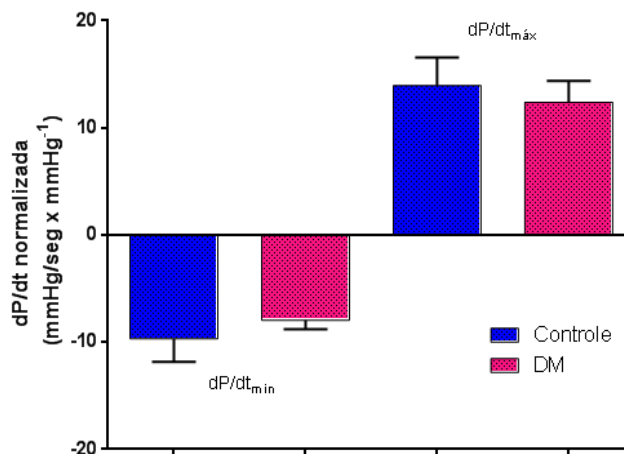


FIGURA 23: Efeitos do DM na velocidade de geração de pressão intraventricular ($dP/dt_{\text{Máx}}$) e na velocidade máxima de relaxamento ($dP/dt_{\text{Mín}}$) normalizados pela PDVE em corações isolados de ratos.

5.5 Análise Histológica

5.5.1 Espessura da Parede Ventricular

A figura 24 representa os efeitos do DM sobre a espessura da parede ventricular esquerda. Não foi encontrado resultado estatisticamente significativo quando comparado os grupos GC e GD ($p = 0,7010$).

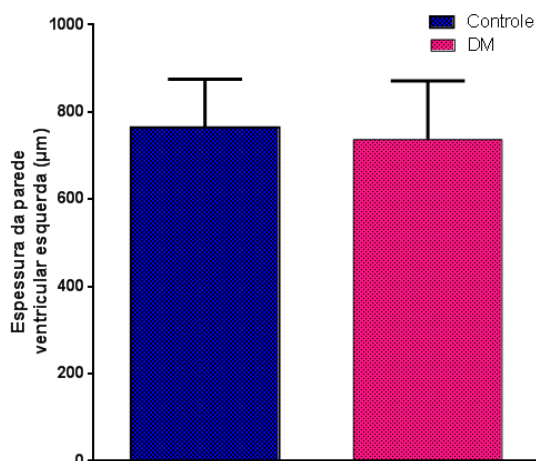


Figura 24: Efeitos do DM sobre a espessura da parede ventricular esquerda. Quantificação da espessura da parede ventricular esquerda entre os grupos diabético e controle. ($n=6$ diabéticos e 6 controles).

5.5.2 Diâmetro dos Cardiomiócitos

Na figura 25A são apresentados fotomicrografias das secções do ventrículo esquerdo utilizadas para mensurar o diâmetro dos cardiomiócitos. Os valores obtidos (FIGURA 25B), não apresentaram diferença significativa entre o GD e GC nas suas medidas ($p = 0,6965$).

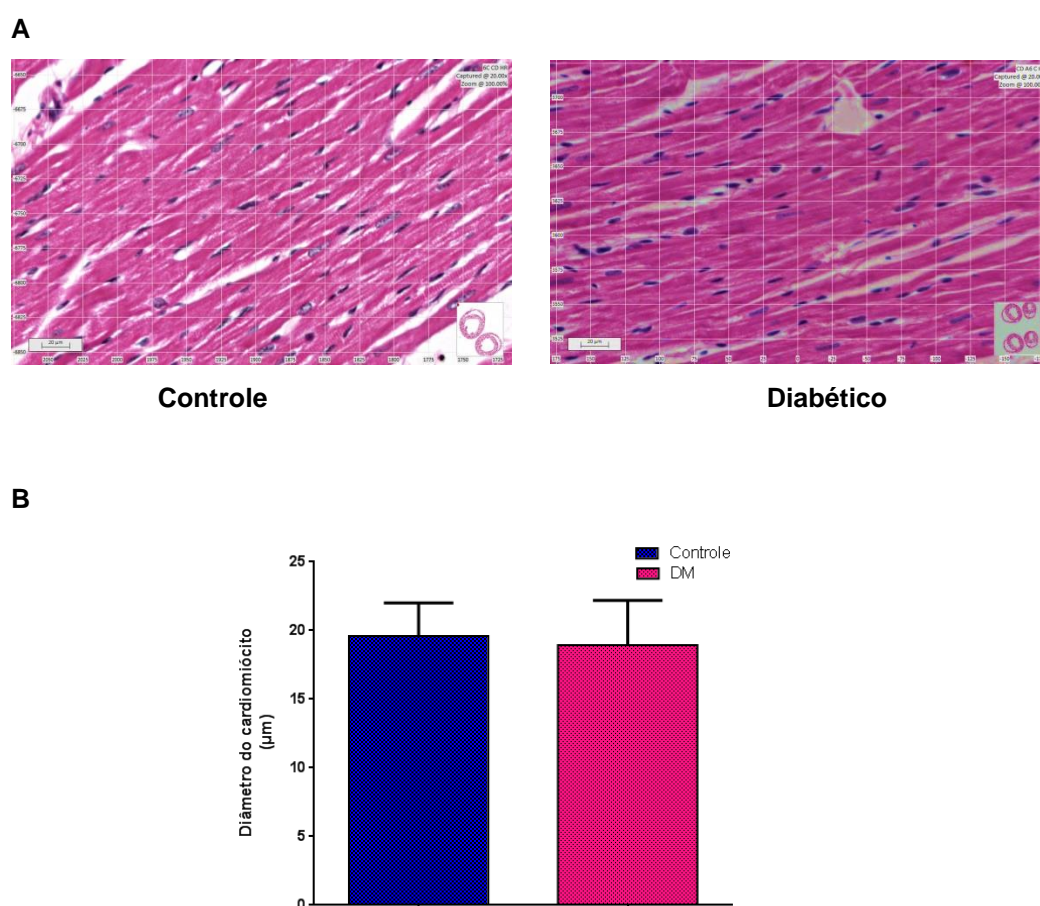


Figura 25: Efeitos do DM no diâmetro dos cardiomiócitos. (A) Fotomicrografias representativas do grupo controle e diabético. (B) Quantificação dos diâmetros dos cardiomiócitos entre os grupos controle e diabético. ($n = 6$ diabéticos e 6 controles).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo teve o objetivo de avaliar a progressão da disfunção autonômica cardíaca em curto prazo, conseqüente ao DM. Os dados obtidos demonstram que o DM ocasiona diminuição da FC e VFC que se inicia após 48 horas e no décimo quarto dia pós-indução do DM; respectivamente. A redução da frequência cardíaca intrínseca também foi observada utilizando a técnica de coração isolado. Além disso, os dados sugerem que houve alteração no balanço simpato-vagal próximo da segunda semana de indução do DM. Após 1 mês da indução do DM, sinais de disfunção cardíaca diastólica, foram identificados.

Como observado na figura 3, o DM foi comprovado desde a primeira semana, como esperado os animais tiveram perda de massa corporal significativa (FIGURA 2) e aumento da glicemia quando comparado ao grupo controle. Neste grupo, a massa aumentou e a glicemia não teve nenhuma mudança confirmando a eficácia do modelo de DM empregado nesse estudo e em outros (DE ANGELIS et al., 2000; HOWARTH et al., 2005; LI et al., 2014; LO GIUDICE et al., 2002; MALFITANO et al., 2014).

O presente estudo encontrou diminuição significativa da FC nos animais diabéticos quando comparados aos animais controles. Estas alterações tornam perceptíveis já nas primeiras 48 horas pós-indução do DM, progredindo com o decorrer das quatro semanas, bem como foi encontrada diminuição da FC intrínseca na técnica de coração isolado. De modo semelhante outros autores (SANYAL et al., 2012; HOWARTH et al., 2005; LO GIUDICE et al., 2002; DE ANGELIS et al., 2002) observaram redução acentuada da FC, pós-indução do DM através do uso de STZ.

A bradicardia encontrada na progressão do DM é um achado comum e frequente na literatura (DE ANGELIS; IRIGOYEN; MORRIS, 2009; HOWARTH et al., 2005; LO GIUDICE et al., 2002; DE ANGELIS et al., 2000). No presente estudo, houve diminuição perceptível da FC logo após 48 horas, esses valores diminuídos podem estar relacionados com algumas alterações metabólicas. Os mecanismos que envolvem a diminuição da FC podem ser citados como defeitos no controle dos mecanismos cardíacos, podendo ser intrínsecos ou extrínsecos (DE ANGELIS; IRIGOYEN; MORRIS, 2009; DALL'AGO et al.,

1999). Por exemplo, cita-se a alteração de sensibilidade nos pressorreceptores cardíacos, localizados no arco aórtico e seio carotídeo. Fisiologicamente, através da mudança nos estímulos de tais estruturas, informações aferentes são enviadas ao SNC o que desencadeia respostas capazes de aumentar ou diminuir a frequência de impulsos enviados para controlar a FC a partir de mudanças na pressão arterial (DALL'AGO et al., 1999). Animais diabéticos apresentam diminuição na sensibilidade dos pressorreceptores quando comparados a animais controles (MORAES-SILVA et al., 2010).

Alterações na sensibilidade dos receptores muscarínicos também podem ser observadas como possíveis precursores da bradicardia encontrada no DM. Hicks e colaboradores (1998), observaram diminuição da taquicardia nos animais diabéticos quando comparados ao grupo controle. Também encontraram aumento da bradicardia nos animais diabéticos de forma mais intensa, porém ambas as alterações de FC que foram induzidas por drogas bloqueadoras dos receptores beta 1 e muscarínico, puderam ser restauradas com administração de insulina. Após 4 semanas da indução do DM, já podiam se observar as alterações tanto de sistema nervoso simpático como parassimpático.

Outra possibilidade de mecanismo defeituoso no curso do DM é a degeneração das terminações nervosas simpáticas e parassimpáticas das células nodais que inervam o nó sinusal. Sanyal e colaboradores (2012) observaram que após 4 semanas de DM induzido por STZ houve degeneração apenas de terminações nervosas parassimpáticas no grupo diabético, caracterizada por uma destruição das vesículas que acomodam os neurotransmissores nas terminações nervosas sinápticas do nodo sinusal, dessa forma, levando ao aumento da resposta parassimpática pela presença anormal na fenda sináptica do neurotransmissor correspondente. Quando os animais foram avaliados 4 meses após o DM, pode-se observar as degenerações em ambos os ramos do SNA. Li e colaboradores (2014) também observaram uma diminuição dos marcadores atriais parassimpático e um aumento dos marcadores simpático, ou seja, uma diminuição do balanço vagal, por uma degeneração inicial de ramo parassimpático através de técnica de imunohistoquímica, onde era mensurada a concentração e expressão de enzimas que refletem danos nos nervos do SNA, observada em oito semanas

de estudo. Demonstrou assim, que no progresso do DM, o primeiro ramo autonômico a ser lesado é o parassimpático e posteriormente o simpático (XUAN et al., 2015; VINIK; ZIEGLER, 2007).

Uma das complicações mais comuns do DM é a NAC, que tem por manifestação clínica principal alteração no controle da FC, que geralmente encontra-se reduzida nos achados patológicos (ZIEGLER, 1994). Sendo assim, um marcador muito importante que vem a caracterizar o DM, a NAC, é geralmente associada à redução dos valores de VFC, ou seja, a capacidade de variação da FC em torno de valores médios (ZIEGLER, 1994; KLEIGER et al., 1987).

No presente estudo foi possível observar diminuição na VFC no tempo que se seguiu o curso do DM experimental, baseado nos dados de diminuição nos valores de SDNN e SD2, por volta do décimo quarto dia pós-indução do DM. Estas são variáveis que estimam o comportamento da VFC global. Os dados encontrados corroboram com alguns estudos que relacionam a diminuição da VFC com a progressão do DM, tanto em seres humanos (GOTTSÄTER et al., 2006), como em ratos (XUAN et al., 2015; HOWARTH et al., 2005; LO GIUDICE et al., 2002).

O índice SDNN representa a VFC global. No presente estudo houve diminuição desse índice nos animais diabéticos, mesmo quando analisado através de um teste estatístico anova de dois fatores (FIGURA 4). Os resultados do estudo de Lo Giudice e colaboradores (2002), que observaram o ECG dos animais por 5 semanas após a indução do DM por STZ, demonstraram de maneira similar redução do índice SDNN. Li e colaboradores (2014) também observaram esse padrão de redução de SDNN após 3-4 semanas do curso do DM.

Com relação a SD1 e SD2, outros índices correspondentes a variabilidade total, os valores de SD1 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos durante o curso do DM. No entanto, quando observado o índice SD2, foi encontrado valor estatisticamente significativo entre os grupos controle e diabético, apresentando diminuição no grupo diabético. Essas duas variáveis, são em geral analisadas em estudos com seres humanos, por exemplo, no estudo de Tarvainen e colaboradores (2014) foi observada diminuição tanto nos valores de SD1 como SD2, em

diabéticos tipo 2.

A evolução temporal das alterações de VFC encontradas nos índices SDNN e SD2 tem padrão semelhante. Na primeira semana acontece um discreto aumento dos seus valores no GD quando comparado ao GC, porém em torno do décimo quarto dia pós-indução de STZ, existe inversão dos valores e o GD apresentou diminuição da VFC que perdurou até o final do experimento. Em ambos os casos, nas primeiras 48 horas acontece um aumento repentino da VFC no GD que não ocorre no GC. Este fenômeno poderia ser explicado pela neurotoxicidade aguda da STZ, no entanto, não existem referências que suportem esta conclusão. Portanto, sugere-se a investigação dessa possível neurotoxicidade da STZ nestas alterações imediatas da VFC que poderiam interferir com a fidedignidade do modelo experimental.

Não foi encontrado na literatura estudos que observam a progressão temporal da VFC nas 48 horas iniciais pós-indução e a cada 72 horas no decorrer de um mês do curso do DM experimental, como a mensuração da VFC realizada no presente estudo. Houveram estudos que observaram alterações globais da VFC, como o de Lo Giudice e colaboradores (2002) somente no período final de *follow up*. De maneira similar ao presente estudo, esses autores, observaram redução do padrão de SDNN nos animais diabéticos no fim do seu experimento de 5 semanas, porém esses valores foram observados somente no final do experimento não sendo relatado o curso temporal das alterações de VFC. Também, similar aos achados no presente estudo, Xuan e colaboradores (2015) observaram redução nos valores de SDNN do GD. Estes autores também não relataram as alterações temporais na VFC. Já de forma inversa, Schaan e colaboradores (2004), não observaram nenhuma diferença no índice SDNN quando comparado os grupos diabético e controle no decorrer do seu estudo, que reuniu dados de estudos prévios do laboratório e analisou a VFC após 7, 14, 30, 45 e 90 dias pós-indução do DM por STZ. No entanto, sua metodologia analisou a VFC através de variação da PA, onde previamente a análise é realizada uma cirurgia invasiva para implantação dos cateteres, o que poderia incorrer em aumento agudo de estresse que influenciaria a medida posterior. No presente estudo, a análise foi realizada através dos dados de ECG após procedimento cirúrgico superficial, e

a coleta era realizada sem a restrição dos animais, diminuindo o fator estresse dos nossos dados e simulando metodologia comumente utilizada na avaliação clínica.

Com relação à razão LF/HF, correspondente ao balanço simpato-vagal, no presente estudo foi encontrada diminuição significativa no GD. Estas variáveis apresentam um padrão similar ao que acontece nos índices de SDNN e SD2. Nas 48 primeiras horas acontece um aumento súbito e importante da razão no GD, porém esse padrão não se prolonga por muito tempo, por volta do décimo segundo dia pós-indução acontece uma inversão desse padrão e o balanço simpato-vagal apresenta redução no grupo diabético. Lo Giudice e colaboradores (2002), também observaram redução da razão LF/HF nos animais diabéticos quando comparado ao grupo controle. Howarth e colaboradores (2005) observaram aumento do balanço simpato-vagal em ratos diabéticos em relação aos controle na 4ª e 8ª semana de seu estudo que se seguiu por 22 semanas, também reportou diminuição do HF no entanto não houve alteração no LF, diferentemente do presente estudo onde aconteceu uma redução de ambos os índices.

No domínio da frequência o índice LF (Low-Frequency – Baixa frequência), reflete uma ação conjunta dos componentes simpáticos e parassimpáticos, com um predomínio simpático (GODOY; TAKAKURA; CORREA, 2005; NOVAIS, L. D., SAKABE, D. I., TAKAHASHI et al., 2004). Dessa forma, alterações em valores correspondentes a esse índice podem nos traduzir alterações do ramo simpático no sistema nervoso autônomo. No presente estudo, existe um aumento inicial do valor de LF nas 48 horas iniciais no GD. No entanto, por volta do décimo segundo dia pós-indução aconteceu a inversão desse padrão seguida de redução significativa dos valores do componente LF nos animais diabéticos, indicando diminuição da atividade simpática neste grupo. Corroborando com o presente achado, Li e colaboradores (2014) e Malfitano e colaboradores (2014) observaram diminuição de LF em quatro semanas de progressão do DM, porém em nenhum dos estudos foi relatado o dia preciso em que iniciaram as primeiras alterações em LF, como observado ser próximo ao 12º dia pós-indução no presente estudo.

Quanto ao componente HF (High Frequency – Alta Frequência), que nos mostra alterações de ramo parassimpático em nível cardíaco (GODOY; TAKAKURA; CORREA, 2005; NOVAIS, L. D., SAKABE, D. I., TAKAHASHI et al., 2004), observou-se no presente estudo, redução inicial dos valores de HF no GD, seguido por uma inversão desse padrão, que se dá em torno do décimo quarto dia pós-indução. Como resultado, houve aumento do índice HF nos animais diabéticos no decorrer de um mês. Sanyal e colaboradores (2012) observaram após um mês da progressão do DM um acometimento inicial do ramo parassimpático, no qual havia destruição das vesículas que acomodavam os neurotransmissores parassimpáticos, podendo levar a uma resposta parassimpática acentuada. Neste mesmo estudo, observou-se que após 4 meses da indução da STZ, o acometimento de ambos os ramos do SNA ocorrem de forma igualitária. Lo Giudice e colaboradores (2002) observaram resultados contrários ao do presente estudo, onde aconteceu redução de HF nos animais diabéticos. Eles também relataram redução ainda maior de valores de LF, cerca de 70%, relacionando com maior ativação parassimpática nos animais diabéticos após 5 semanas da administração de STZ. Os dados de Howarth e colaboradores (2005) também demonstraram diminuição dos valores espectrais de HF após 4 semanas de indução de STZ, essa se perdura na 8, 12, 16 e 22^o semanas após injeção da droga. Já no estudo de Malfitano et al., (2014) não houve diferença de valores de HF entre os animais diabéticos e controles. No entanto, nenhum dos estudos acima relatou análise temporal dos dados de HF, onde se apresentam os primeiros sintomas de comprometimento autonômico. A importância da análise temporal, observada no presente estudo, é discriminar o surgimento dos primeiros sinais e sintomas ocasionados pela NAC no DM e possivelmente contribuir para a elaboração de tratamentos mais precisos para esta condição e determinar se sua administração deve ser precoce.

Em estudos com seres humanos, existe predomínio basal parassimpático, ou seja, embora a FC intrínseca do coração seja relativamente alta, em torno de 100 batimentos por minuto (bpm), o mecanismo que faz com que esses valores em condições normais, num indivíduo saudável em repouso estejam por volta de 70 bpm, é o predomínio basal do ramo parassimpático (EWING et al., 1985). Isso é o inverso do que acontece no rato, onde existe

predomínio simpático elevando seus valores de normalidade da FC de repouso em torno de 345-350 bpm (SANTOS et al., 2013; DA SILVA et al., 2001).

Nesse contexto, quando observadas as consequências do DM em seres humanos, na presença de DM tipo 1 (CHESSA et al., 2002), observa-se comprometimento precoce da atividade parassimpática pela diminuição do índice de LF, com um provável predomínio da atividade do sistema simpático observado pelo aumento da razão LF/HF (CHESSA et al., 2002; HOWORKA; PUMPRLA; SCHABMANN, 1998). Howorka e colaboradores (1998) observaram que no curso do DM, em portadores de NAC, existe disfunção vagal primeiramente, e de forma mais tardia uma disfunção simpática através de redução de índices espectrais. Esses valores coincidem com uma maior FC em repouso encontrada em pacientes diabéticos, que corresponde aos danos parassimpáticos encontrados nas fases iniciais do DM.

Ainda nos resultados obtidos no presente estudo analisamos a variável de domínio de tempo rMSSD que tem forte ligação com alterações de sistema parassimpático. Embora as inclinações das retas encontradas na figura 8 sejam diferentes, ambas apresentam um mesmo padrão de progressão, mas no GD este padrão está elevado no curso de um mês em relação ao GC. Li e colaboradores (2014) observaram redução dos valores de rMSSD ao final de 8 semanas nos animais diabéticos. Schaan e colaboradores também observaram redução desse índice em torno de 45 dias após a indução do DM, nos animais diabéticos em relação aos controle. No entanto em ambos os estudos o tempo avaliado é superior ao observado no presente estudo.

O último índice ainda observado na VFC foi a entropia de Shannon, esta não apresentou diferença estatística no decorrer de um mês entre os grupos. Essa variável está relacionada a medidas de longos períodos, onde é necessária uma coleta de várias horas para que seja feita uma análise efetiva. Dessa forma, não sendo um bom índice para analisar os efeitos do DM a curto prazo, como foi realizada no presente estudo em coletas de uma hora diária no intervalo de um mês.

No presente estudo, foi investigado possíveis alterações do intervalo QTc que corresponde à duração total da atividade elétrica ventricular (COSTA et al., 2008; NOVAIS, L. D., SAKABE, D. I., TAKAHASHI et al., 2004). Já é conhecido que o aumento nos valores de tal intervalo está relacionado com a

NAC (VANHOOSE et al., 2010; MARTHUR E GUPTA, 2006). No entanto, não foram encontradas alterações no QTc entre os animais diabéticos e controle no presente estudo. Costa e colaboradores (2008), observaram aumento no intervalo QTc em animais diabéticos, sem tratamento, após 15 e 30 dias de experimento. Vanhose e colaboradores (2010), também encontraram aumento no intervalo QTc em animais diabéticos comparados aos animais controle após sete semanas da indução do DM. Sugere-se que esse aumento pode estar relacionado com a poliúria encontrada no DM, essa pode causar perda excessiva de potássio, ocasionando um possível aumento temporal na repolarização da membrana, aumentando tal intervalo (HOWARTH et al., 2005).

O intervalo PR foi um dos eventos eletrocardiográficos analisado, este representa o intervalo entre o início da ativação atrial e início da ativação ventricular. No presente estudo não foi encontrada diferença estatística entre os momentos basais, antes da indução da STZ e no 26º dia pós a indução da droga. Da mesma forma, não foi encontrada diferença significativa no presente estudo no intervalo QRS. Vanhose e colaboradores (2010) observaram alargamento tanto do intervalo PR como do intervalo QRS em animais diabéticos quando comparado aos animais controles, contudo isso ocorreu após 11 semanas. Estas alterações de condutibilidade descritas foram observadas num tempo relativamente maior ao observado no presente estudo, tempo esse, que pode ter levado a um remodelamento mais acentuado do miocárdio. A hiperglicemia ocasionada pelo DM, pode levar ao remodelamento das proteínas estruturais do miocárdio, tais mudanças ocasionadas pela fibrose, geram um aumento da rigidez cardíaca, que leva a alterações de condutividade elétrica (DUNCAN, 2011; MAYA; VILLARREAL, 2010; BUGGER; ABEL, 2009). Essas alterações estruturais podem estar relacionadas com os achados encontrados nas alterações de ECG no curso do DM.

Em relação aos dados funcionais do músculo cardíaco, obtidos através da técnica de coração isolado, os valores da variável FC apresentaram diminuição no grupo diabético em relação ao grupo controle. Para essa análise, não houve clampeamento da frequência, ou seja, não houve qualquer tipo de estimulação elétrica que levasse a uma padronização da FC nos corações observados no presente estudo. Esses dados podem corroborar com estudos

prévios que analisaram alterações no nó sinusal no curso do DM (SANYAL et al., 2012, SCHAAN et al., 2004). Essas modificações que o DM realiza no nó sinusal, tanto de disfunção de componentes autonômicos, a curto prazo o primeiro componente lesado é o parassimpático (SANYAL et al., 2012), pode ser a origem da disfunção no automatismo do coração, levando a diminuição da FC intrínseca nos animais diabéticos.

Observa-se também, tendência de diminuição da pressão normalizada nos animais diabéticos quando comparado aos animais controle. Para esta análise foi realizada a normalização dos dados através do duplo produto (duplo produto), porque no nosso estudo não houve um clameamento da FC do coração isolado e esta era diferentes entre os grupos experimentais, conforme descrito previamente. O DP tem sido também utilizado como índice que representa o metabolismo cardíaco (GOBEL et al., 1977). Zhao e colaboradores (2010) descreveram diminuição da pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo;contudo, após 14 semanas do DM experimental. Os autores também observaram a presença de fibrose intersticial cardíaca nos animais diabéticos. Esses valores relatam que possivelmente a progressão do DM gera um remodelamento cardíaco, levando a fibrose e possivelmente rigidez da parede ventricular podendo evoluir para disfunção diastólica, bem como alterações na condutibilidade elétrica do coração (ZHAO et al., 2010; ASBUN; VILLARREAL, 2006; BUGGER; ABEL, 2009).

Sinais de disfunção diastólica foram observados no GD uma vez que houve forte tendência à diminuição do valor da dP/dt mínima ($p= 0,051$). Zhao e colaboradores (2010) observaram resultados similares ao presente estudo. Nos valores de dP/dt máxima não houve diferença estatística entre os grupos. Mourouzis e colaboradores (2014) também observaram diminuição significativa no curso de 8 semanas do DM, na variável dP/dt mínima. No entanto, não encontrou diferença significativa nos valores de dP/dt máxima entre os grupos. Esses estudos confirmam a relação entre a diminuição da velocidade de relaxamento associada à presença de fibrose, levando a posterior disfunção diastólica, prejudicando como um todo a função mecânica do miocárdio (ZHAO et al., 2010). Embora o *follow up* do presente estudo tenha sido em um tempo relativamente menor que os estudos citados anteriormente, os resultados encontrados confirmam que os animais diabéticos já apresentam sinais de

disfunção diastólica, a qual tende a aumentar com o progredir do tempo devido a alterações estruturais que levam a um remodelamento cardíaco ocasionado pelo DM experimental.

Por fim, investigamos a presença de alterações celulares, que poderiam modificar a funcionalidade do miocárdio. Na análise histológica da espessura do ventrículo esquerdo através do método HE, não foi encontrada diferença estatística entre os grupos nas mensurações. Quanto à análise morfológica do diâmetro das células cardíacas pela mesma coloração, também não se observou diferença significativa entre os grupos. Esses dados confirmam que não existem alterações morfológicas marcantes que expliquem as alterações mecânicas de disfunção diastólica encontradas previamente. No entanto, é necessária uma análise mais precisa da presença de fibrose no tecido cardíaco, como a que foi realizada no estudo de Silva (2014), onde através de técnica de coloração por *picrosirius red*, que analisa o conteúdo de colágeno total, foi observado maior depósito de colágeno na MEC nos ratos diabéticos sedentários quando comparado ao grupo controle sedentários em 6 semanas do DM experimental.

Uma complicação comum no DM, é a MCD, onde em estágios mais avançados da doença são encontradas alterações progressivas no nível celular, que são hipertrofia e fibrose dos cardiomiócitos, bem como um aumento da espessura ventricular e agravamento da disfunção diastólica e disfunção sistólica inicial (PAPPACHAN et al., 2013). Essa progressão da MCD, pode justificar os achados encontrados no nosso estudo a nível funcional, de disfunção diastólica, como as características de uma possível progressão de MCD em fase inicial.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou haver alterações precoces no controle autonômico cardíaco de animais diabéticos caracterizada por intensa diminuição da frequência cardíaca e alterações da VFC global e balanço simpato-vagal iniciadas por volta da segunda semana. Contudo, a redução da FC basal apesar de ter componente autonômico, está relacionada à diminuição da frequência cardíaca intrínseca, observada em experimentos utilizando corações isolados.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Peripheral arterial disease in people with diabetes. **Diabetes Care**. v. 26, n. 12, p. 3333-3341, 2003.
- ANEJA, A.; TANG, W. H. W.; BANSILAL, S.; GARCIA, M. J.; FARKOUH, M. E. Diabetic cardiomyopathy: Insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options. **American Journal of Medicine**. v.121, n. 9, p. 457-78, 2008.
- AUBERT, A.E.; SEPS, B.; BECKERS, F. Heart rate variability in athletes. **Sports Medicine**. v. 33, n. 12, p. 889-919, 2003.
- ASBUN, J.; VILLARREAL, F.J. The pathogenesis of myocardial fibrosis in the setting of diabetic cardiomyopathy. **American College of Cardiology Foundation**. v. 47, n. 4, p. 693-700, 2006.
- BERNE, R. B.; LEVY, M. N. **Tratado De Fisiologia Humana**. In: BERNE,R.B; LEVY, M.N. (Org.) 4 Ed. Rj. Guanabara Koogan, p. 97-108, 2000.
- BILIM, O.; TAKEISHI, Y.; KITAHARA, T.; ARIMOTO, T.; NIIZEKI, T.; SASAKI, T.; GOTO, K.; KUBOTA, I. Diacylglycerol kinase zeta inhibits myocardial atrophy and restores cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Cardiovasc Diabetol**. v.7, n. 2, 2008.
- BONETTI, P.O.; LERMAN, L.O.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 23, p. 168-75, 2003.
- BOULTON, A.J.; MALIK, R.A.; AREZZO, J.C.; SOSENKO, J.M. Diabetic somatic neuropathies. **Diabete Care**. v. 27, n. 6, p. 1458-1486, 2004.
- BROWNLEE, M. The Pathobiology of Diabetic Complications. **Diabetes**. v.54, p. 615-626, 2005.
- BUGGER, H.; ABEL, E.D. Rodent models of diabetic cardiomyopathy. **Disease Models & Mechanisms**. v. 2, n. 9-10, p. 454-466, 2009.
- BURLEW, B. S.; WEBER, K. T. Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction. **Herz**. v. 27, p. 92-8, 2002.
- CAMERON, N. E.; COTTER, M. A. Metabolic and vascular factors in pathogenesis of diabetic neuropathy. **Diabetes**. v. 26, n. 2, p. 31-7, 1997.
- CHESSA, M. et al. Role of heart rate variability in the early diagnosis of diabetic autonomic neuropathy in children. **Herz**, v. 27, n. 8, p. 785–790, 2002.

COSTA, E. C. D. S. et al. Os efeitos da metformina sobre a dispersão do intervalo QT e QTc de ratos diabéticos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, n. 4, p. 254–260, 2008.

DA SILVA, V.J.D.; VIANA, P.C.C.; ALVES, R.M.; SALGADO, H.C.; MONTANO, N.; FAZAN, JR.R. Antihypertensive Action of Amiodarone in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**. v.38, p. 597-601, 2001.

DESHPANDE, A.D.; HARRIS-HAYES, M.; SCHOOTMAN, M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. **Physical Therapy**. v. 88, n. 11, p. 1254-1264, 2008.

DE ANGELIS, K. et al. Cardiovascular control in experimental diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 9, p. 1091–1100, set. 2002.

DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. C.; MORRIS, M. Diabetes and cardiovascular autonomic dysfunction: application of animal models. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 145, n. 1-2, p. 3–10, 28 jan. 2009.

DE ANGELIS, K. L. et al. Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 33, n. 6, p. 635–41, jun. 2000.

DE CATARINA, R. Endothelial dysfunctions: common denominators in vascular disease. **Current Opinion in Lipidology**. v. 11, p. 9-23, 2000.

DIAS, F.A.; WALKER, L.A.; ARTEAGA, G.M.; WALKER, J.S.; VIJAYAN, K.; PENA, J.R. et al. The effect of myosin regulatory light chain phosphorylation on the frequency-dependent regulation of cardiac function. **J Mol Cell Cardiol**. n. 26, 2006.

DICK, P. J.; KATZ, K.M.; KAMES, J.L.; LITCHY, W.J.; KLEIN, R.; PACH, J.M.; WILSON, D.M.; O'BRIEN, P.C.; MELTON, L.J.; SERVICE, F.J. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy and nephropathy in a population-based co-hort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. **Neurology**. v. 43, p. 817-824, 1993.

DUNCAN, J.G. Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1813, n. 7, p. 1351-1359, 2011.

ECKARDT, L.; HAVERKAMP, W.; JOHNA, R.; BOCKER, D.; DENG, M.C.; BREITHARDT, G. et al. Arrhythmias in heart failure: current concepts of mechanisms and therapy. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**. v. 11, n. 1, p. 106-117, 2000.

EDWARDS, J. L.; VICENT, A.; CHENG, T.; FELDMAN, E. L. Diabetic neuropathy: Mechanisms to management. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 120, n. 1, p. 1-34, 2008.

- EWING, D.J.; MARTYN, C.N.; YOUNG, R.J.; CLARKE, B.F. The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. **Diabetes Care**. v. 8, p. 491-498, 1985.
- FREEMAN, R. Autonomic peripheral neuropathy. **The Lancet**. v. 365, p. 1259-70, 2005.
- GERRITSEN, J.; DEKKER, J.M.; TENVOORDE, B.J.; KOSTENSE, P.J.; HEINE, R.J.; BOUTER, L.M. et al. Impaired autonomic function is associated with increased mortality, especially in subjects with diabetes, hypertension, or a history of cardiovascular disease: the Hoorn Study. **Diabetes Care**. v. 24, n. 10, p. 1793-1798, 2001.
- GOBEL, F.L.; NORDSTROM, L.A.; NELSON, R.R.; JORGENSEN, C.R.; WANG, Y. The Rate-Pressure Product as an Index of Myocardial Oxygen Consumption during Exercise in Patients with Angina Pectoris. **Circulation**. v. 57, n. 3, 1978.
- GODOY, M.F.; TAKAKURA, I.T.; CORREA, P.R. Relevância da análise do comportamento dinâmico não-linear (Teoria do Caos) como elemento prognóstico de morbidade e mortalidade em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica. **Arquivos de Ciências da Saúde**. v. 12, n. 4, p. 167-171, 2005.
- GOTTSÄTER, A. et al. Decreased heart rate variability may predict the progression of carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. **Journal of the Clinical Autonomic Research Society**, v. 16, n. 3, p. 228–34, jun, 2006.
- GREENE, D.A.; SIMA, A. A.; STEVENS, M.J. et. al. Complications: Neuropathy, pathogenetic considerations. **Diabetic Care**. v. 15, p. 1902-25, 1992.
- GUS, I. **Eletrocardiografia – exames normais e patológicos com noções de vectocardiografia**. 4^o Ed. Rj. Rubio Ltda. 2007.
- HOWARTH, F. C. et al. Long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. **Experimental physiology**, v. 90, n. 6, p. 827–35, nov. 2005.
- HOWORKA, K.; PUMPRLA, J.; SCHABMANN, A. Optimal parameters of short-term heart rate spectrogram for routine evaluation of diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 69, n. 2-3, p. 164–72, 30 abr. 1998.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas 2014 Update 6th edn. Brussels, Belgium: **International Diabetes Federation**, 2012. http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_ES.pdf [April, 2015].
- KHAVANDI, K.; KHAVANDI, A.; ASGHAR, O.; GREENSTEIN, A.; WITHERS, S.; HEAGERTY, A.M. et al. Diabetic cardiomyopathy--a distinct disease Best

Pract Res. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 23, n. 3, p. 347-360, 2009.

KINLAY, S.; LIBBY, P.; GANZ, P. Endothelial function and coronary artery disease. **Current Opinion in Lipidology**. v.12, p. 383-9, 2001.

KLEIGER RE, MILLER JP, BIGGER JT JR, MOSS AJ. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. **American Journal of Cardiology**. v. 59, p.256–62, 1987.

LAROSA, C.; SGUEGLIA, G.A.; SESTITO, A.; INFUSINO, F.; NICCOLI, G.; LAMENDOLA, P.; MARIANI, L.; SANTANGELI, P.; LOMBARDO, A.; CREA, F.; LANZA, G.A. Predictors of impaired heart rate variability and clinical outcome in patients with acute myocardial infarction treated by primary angioplasty. **Journal of Cardiovascular Medicine**. v.9, n.1, p.76-80, 2008.

LI, X. et al. Effect of Guizhi Decoction ([symbols; see text]) on heart rate variability and regulation of cardiac autonomic nervous imbalance in diabetes mellitus rats. **Chinese journal of integrative medicine**, v. 20, n. 7, p. 524–33, jul. 2014.

LIAO, D.; CARNETHON, M.; EVANS, G.W.; CASCIO, W.E.; HEISS, G. Lower heart rate variability is associated with the development of coronary heart disease in individuals with diabetes: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. **Diabetes**. v. 51, n. 12, p. 3524-3531, 2002.

LIBBY, P.; RIDKER, P.M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**. v. 105, p. 1135-43, 2002.

LIMONGELLI, G.; MIELE, T.; PACILEO, G.; DI SALVO, G.; CALABRO, P.; ANCONA, R.; GALA, S.; REA, A.; VERRENGIA, M.; CALABRO, R. Heart rate variability is a weak predictor of sudden death in children and young patients with hypertrophic cardiomyopathy. **Heart**. v.93, p.117–118, 2007.

LO GIUDICE, P. et al. Autonomic neuropathy in streptozotocin diabetic rats: effect of acetyl-L-carnitine. **Diabetes research and clinical practice**, v. 56, n. 3, p. 173–80, jun. 2002.

MALFITANO, C. et al. Diabetic hyperglycemia attenuates sympathetic dysfunction and oxidative stress after myocardial infarction in rats. **Cardiovascular diabetology**, v. 13, p. 131, jan. 2014.

MASER, R.E.; MITCHELL, B.D.; VINIK, A.I.; FREEMAN, R. The Association Between Cardiovascular Autonomic Neuropathy and Mortality in Individuals with Diabetes. **Diabetes Care**. v. 26, p. 1895–1901, 2003.

MATHUR, R.; GUPTA, S.K.; SINGH, N.; MATHUR, S.; KOCHUPILLAI, V.; VELPANDIAN, T. Evaluation of the effect of *Withania somnifera* root extracts on cell cycle and angiogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 105, p. 336–341, 2006.

MAYA, L.; VILLARREAL, F.J. Diagnostic approaches for diabetic cardiomyopathy and myocardial fibrosis. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 48, n. 3, p. 524-529, 2010.

MONTANO, N.; RUSCONE, T.G.; PORTA, A.; LOMBARDI, F.; PAGANI, M.; MALLIANI, A. Power Spectrum Analysis of Heart Rate Variability to Assess the Changes in Sympathovagal Balance During Graded Orthostatic Tilt. **Circulation**. v.90, n.4, p.1826-1831, 1994.

MORAES-SILVA, I. C. et al. Baroreflex deficit blunts exercise training-induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 37, n. 3, p. e114–20, mar. 2010.

MOUROUZIS, I. et al. The beneficial effects of ranolazine on cardiac function after myocardial infarction are greater in diabetic than in nondiabetic rats. **Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics**, v. 19, n. 5, p. 457–69, set. 2014.

NOVAIS, L.D.; SAKABE, D.I.; TAKAHASHI, A.C.M.; GONGORA, H.; TACIRO, C.; MARTINS, L.E.B.; et al. Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca em repouso de homens saudáveis sedentários e de hipertensos e coronariopatas em treinamento físico. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. v. 8, n. 3, p. 207-213, 2004.

O'BRIEN, P.D.; HINDER, L.M.; SAKOWSKI, S.A.; FELDMAN, E.L.; ER stress in diabetic peripheral neuropathy: a new therapeutic target. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 21, n. 4, p. 621-33, 2014.

PASCHOAL, M.A.; PETRELLUZZI, K.F.S.; GONÇALVES, N.V.O. Controle autonômico cardíaco durante a execução de atividade física dinâmica de baixa intensidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Cardiologia**. v. 13, p. 1-11, 2003.

PAUSCHINGER, M.; KNOPF, D.; PETSCHAUER, S.; DOERNER, A.; POLLER, W.; SCHWIMBECK, P.L. et al. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. **Circulation**. v. 99, n. 21, p. 2750-2756, 1999.

PUMPRLA, J.; HOWORKA, K.; GROVES, D.; CHESTER, M.; NOLAN, J. Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. **International Journal of Cardiology**. v. 84, n.1, p. 1-14, 2002.

RIBEIRO, J.P.; MORAES FILHO, R.S. Variabilidade da frequência cardíaca como instrumento de investigação do sistema nervoso autônomo. **Revista Brasileira de Hipertensão**. v. 12, n. 1, p. 14-20, 2005.

RIZZI, E, et. al. Tempol inhibits TGF- β and MMPs upregulation and prevents cardiac hypertensive changes. **Journal Cardiology**. v.165, p. 165-73, 2013.

ROCHA, R.M.; ALBUQUERQUE, D.C.; ALBANESI FILHO, F.M. Variabilidade da frequência cardíaca e ritmo circadiano em pacientes com angina estável. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**. v. 18, n. 4, p. 429-42, 2005.

ROQUE, J.M.A. **Variabilidade da Frequência Cardíaca**. Trabalho de Graduação (Licenciatura em Educação Física) - Faculdade de Ciência e Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2009.

RUBLER, S.; DLUGASH, J.; YUCEOGLU, Y.Z.; KUMRAL, T.; BRANWOOD, A.W.; GRISHMAN, A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. **American Journal of Cardiology**. v. 30, p. 595-602. 1972.

SALEH, A.; ROY CHOWDHURY, S.K.; SMITH, D.R.; et al. Ciliary neurotrophic factor activates NF- κ B to enhance mitochondrial bioenergetics and prevent neuropathy in sensory neurons of streptozotocin-induced diabetic rodents. **Neuropharmacology**. v. 65, p. 65–73. 2013.

SANTOS, M. R. V. et al. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia plena**, v. 8, n. 2003, p. 1–6, 2013.

SCHAAN, B. D. et al. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Brazilian journal of medical and biological research**. v. 37, n. 12, p. 1895–902, dez. 2004.

SILVA, F. S. **Efeitos do treinamento aeróbico sobre sinais precoces do remodelamento do ventrículo esquerdo induzido pelo diabetes mellitus experimental**. Dissertação – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, Fevereiro, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de diabetes. **Diretrizes SBD**. p. 25, 2009.

TARVAINEN, M. P. et al. Cardiac autonomic dysfunction in type 2 diabetes - effect of hyperglycemia and disease duration. **Frontiers in endocrinology**, v. 5, p. 130, jan. 2014.

TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. **Circulation**. v. 93, n. 5, p. 1043-1065, 1996.

TOMLINSON, D. R. Future prevention and tratamento of diabetic neuropathy. **Diabetes Metabolism**. v. 24, n. 3, p. 79-83, 1998.

VANDER, A. J.; SHERMAN, J. H.; LUCIANO, D. S. **Fisiologia Humana: os mecanismos da função dos órgãos e sistemas**. 3^o Ed. São Paulo. McGraw-Hill. 1981.

VANDERLEI, L.C.M.; PASTRE, C.M.; HOSHI, R.A.; CARVALHO, T.D.; GODOY, M.F. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**. v. 24, n. 2, p. 205-217, 2009.

VANHOOSE, L. et al. Electrocardiographic changes with the onset of diabetes and the impact of aerobic exercise training in the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat. **Cardiovascular diabetology**, v. 9, p. 56, 2010.

VINCENT, A.M.; MCLEAN, L.L.; BACKUS, C.; et al. Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons. **The FASEB Journal**. v. 19, p. 638–40, 2005.

VINIK, A. I.; MASER, R. E.; MITCHELL, B. D.; FREEMAN, R. Diabetic autonomic neuropathy. **Diabetes Care**. v. 26, n. 5, p.1553-79, 2003.

VINIK, A. I.; MEHRABYAN, A.; COLEN, L.; BOUTON, A. Focal entrapment neuropathies in diabetes. **Diabetes Care**. v. 27, n.7, p. 1783-88, 2004.

XUAN, Y.-L. et al. In rats the duration of diabetes influences its impact on cardiac autonomic innervations and electrophysiology. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 189, p. 31–6, maio 2015.

ZHAO, S.-M. et al. Cardiac fibrosis in diabetic rats: regulation and mechanism of activation of the PPARgamma signal pathway. **The Chinese journal of physiology**, v. 53, n. 4, p. 262–7, 31 ago. 2010.

ZIEGLER, D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy: prognosis, diagnosis and treatment. **Diabetes/metabolism reviews**, v. 10, n. 4, p. 339–83, dez. 1994.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes care**. v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WYSOCKI, A. B.; STAIANO-COICO, L.; GRINNELL, F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. **The Journal of Investigative Dermatology**. v. 101, n. 1, p. 64–8, jul. 1993.

YOUNG, M.J.; BOULTON, A.J.M; MCLEOD, A.F.; WILLIAMS, D.R.R.; SONKSEN, P.H. A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the UK hospital clinic population. **Diabetologia**. v. 36, p. 150-156, 1993.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 -	MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DADOS DE MASSA CORPORAL E GLICEMIA	72
APÊNDICE 2 -	MÉDIA E ERRO DA MÉDIA DOS DADOS DE VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA	73
APÊNDICE 3 -	MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DADOS DE CORAÇÃO ISOLADO	76

APÊNDICE 1 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DADOS DE MASSA CORPORAL E GLICEMIA

MASSA CORPORAL (g)						
CONTROLE				DM		
TEMPO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	N
Basal	239,0833	13,55432	12	238,0833	9,558037	12
7 dias	266,5	16,21167	12	207,3333	14,36114	12
14 dias	285,8333	13,78954	12	203,25	14,18145	12
26 dias	324,1667	33,41974	12	196,5833	18,89905	12

GLICEMIA (mg/dL)						
CONTROLE				DM		
TEMPO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	N
Basal	78,08334	12,47877	12	80,83334	7,767454	12
7 dias	91,91666	22,2566	12	387,5833	72,02962	12
14 dias	83	14,75867	12	416,6667	78,6284	12
26 dias	82,33334	11,59415	12	452,5833	65,1843	12

APÊNDICE 2 - MÉDIA E ERRO DA MÉDIA DOS DADOS DE VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

SDNN						
CONTROLE				DM		
TEMPO	MÉDIA	ERRO DA MÉDIA	N	MÉDIA	ERRO DA MÉDIA	N
Basal	7,023358	2,620838	12	7,414534	2,737361	12
24 horas	6,192925	1,97296	12	6,623175	3,125837	12
48 horas	6,727217	3,181309	12	8,050508	3,374746	12
5 dias	5,903525	1,39099	12	7,430509	2,911128	12
8 dias	6,679358	1,880571	12	6,562272	4,143425	12
11 dias	6,73905	2,035388	12	5,324783	2,61719	12
14 dias	7,718383	3,627958	12	5,7696	2,607582	12
17 dias	8,576775	4,327169	12	6,357942	2,610904	12
20 dias	7,700683	3,518384	12	5,637908	2,442671	12
23 dias	7,335225	1,508623	12	5,655108	2,822685	12
26 dias	7,377692	1,771932	12	6,191825	2,651639	12

Rmssd						
CONTROLE				DM		
TEMPO	MÉDIA	ERRO DA MÉDIA	N	MÉDIA	ERRO DA MÉDIA	N
Basal	3,605183	1,314921	12	3,456858	1,067051	12
24 horas	3,121917	1,402294	12	3,328067	1,474737	12
48 horas	2,614267	1,298012	12	3,436758	1,18771	12
5 dias	2,853467	1,040757	12	3,292726	1,374144	12
8 dias	2,695008	1,223387	12	3,1771	1,973055	12
11 dias	2,944235	1,358541	12	2,732067	1,226363	12
14 dias	3,03865	0,856545	12	2,595133	0,919742	12
17 dias	2,456383	0,780767	12	2,780667	1,14183	12
20 dias	3,243983	1,275109	12	2,989133	1,502325	12
23 dias	3,1569	1,046718	12	3,72425	2,645122	12
26 dias	4,416958	2,768938	12	4,055208	1,850799	12

LF/HF						
CONTROLE				DM		
TEMPO	MÉDIA	ERRO DA MÉDIA	N	MÉDIA	ERRO DA MÉDIA	N
Basal	0,974612	0,740063	12	0,792617	0,349011	12
24 horas	1,01742	0,686465	12	0,956666	0,384403	12
48 horas	0,969672	0,733616	12	1,412694	0,628794	12
5 dias	0,860864	0,61231	12	1,102495	0,577114	12
8 dias	1,118623	0,493117	12	0,693349	0,310308	12
11 dias	1,012342	0,439988	12	0,786807	0,448192	12
14 dias	1,005095	0,570021	12	0,863239	0,676358	12
17 dias	1,510511	1,126252	12	0,723088	0,414257	12
20 dias	1,004375	0,525388	12	0,860173	0,716655	12
23 dias	1,405788	1,146309	12	0,740465	0,615447	12

26 dias	0,968889	0,728354	12	0,647118	0,343487	12
---------	----------	----------	----	----------	----------	----

LF (n.u.)						
CONTROLE				DM		
TEMPO	MÉDIA	ERRO DA MÉDIA	N	MÉDIA	ERRO DA MÉDIA	N
Basal	44,42475	16,55754	12	42,16158	11,63923	12
24 horas	46,7495	15,55037	12	47,0975	10,17672	12
48 horas	44,123	15,58379	12	55,57892	13,18491	12
5 dias	41,59467	15,90611	12	48,69592	15,36232	12
8 dias	50,27842	11,88085	12	39,18792	10,71537	12
11 dias	48,09267	11,18099	12	40,87458	14,18586	12
14 dias	46,96317	12,32927	12	41,05858	16,31148	12
17 dias	54,57891	18,04912	12	38,86133	14,43255	12
20 dias	46,84467	14,36875	12	40,07067	18,47173	12
23 dias	51,13075	18,01987	12	37,059	17,61081	12
26 dias	44,51525	18,62281	12	36,96175	12,40558	12

HF (n.u.)						
CONTROLE				DM		
TEMPO	MÉDIA	ERRO DA MÉDIA	N	MÉDIA	ERRO DA MÉDIA	N
Basal	55,56984	4,779039	12	57,82833	3,358434	12
24 horas	53,2445	4,488585	12	52,91325	2,941395	12
48 horas	55,86842	4,498382	12	44,41683	3,806363	12
5 dias	58,39508	4,590842	12	51,30267	4,434762	12
8 dias	49,71542	3,429495	12	60,81092	3,093477	12
11 dias	51,89791	3,226785	12	59,12466	4,095129	12
14 dias	53,03008	3,558297	12	58,94	4,708608	12
17 dias	45,33216	5,20403	12	61,13658	4,166168	12
20 dias	53,14992	4,147696	12	59,92875	5,332215	12
23 dias	48,86325	5,201985	12	62,94008	5,083735	12
26 dias	55,47467	5,37461	12	63,28817	3,703635	12

SD1						
CONTROLE				DM		
TEMPO	MÉDIA	ERRO DA MÉDIA	N	MÉDIA	ERRO DA MÉDIA	N
Basal	2,549708	0,930011	12	2,444808	0,754651	12
24 horas	2,210292	0,991725	12	2,353783	1,043037	12
48 horas	1,8488	0,918316	12	2,43065	0,839973	12
5 dias	2,018088	0,736051	12	2,328867	0,971892	12
8 dias	1,904816	0,864738	12	2,080419	1,02355	12
11 dias	2,082249	0,960792	12	1,932362	0,867496	12
14 dias	2,149067	0,605778	12	1,8355	0,650538	12
17 dias	1,7337	0,557821	12	1,966743	0,807678	12
20 dias	2,294277	0,901843	12	2,114175	1,062533	12

23 dias	2,151742	0,678251	12	2,338567	1,317582	12
26 dias	3,124005	1,958593	12	2,972325	1,214399	12

SD2						
CONTROLE				DM		
TEMPO	MÉDIA	ERRO DA MÉDIA	N	MÉDIA	ERRO DA MÉDIA	N
Basal	9,570875	3,656568	12	10,16924	3,872245	12
24 horas	8,447042	2,701999	12	9,013825	4,405105	12
48 horas	9,295359	4,485278	12	11,06399	4,841466	12
5 dias	8,082142	1,907324	12	10,19145	4,138869	12
8 dias	9,234194	2,582474	12	8,933859	5,805497	12
11 dias	9,271341	2,819289	12	7,264409	3,630261	12
14 dias	11,87979	5,232096	12	7,917217	3,705862	12
17 dias	11,49565	5,821989	12	8,717767	3,745932	12
20 dias	10,60222	4,994589	12	7,639467	3,408768	12
23 dias	10,09594	2,133342	12	7,228758	3,247213	12
26 dias	9,838609	2,219406	12	7,984217	4,053575	12

SHANNON en						
CONTROLE				DM		
TEMPO	MÉDIA	ERRO DA MÉDIA	N	MÉDIA	ERRO DA MÉDIA	N
Basal	3,7908	0,328213	12	3,8378	0,383675	12
24 horas	3,841725	0,293203	12	3,708133	0,356084	12
48 horas	3,994367	0,342063	12	3,752758	0,49115	12
5 dias	4,0193	0,386725	12	3,880075	0,362117	12
8 dias	3,941742	0,223096	12	3,889775	0,421137	12
11 dias	4,030567	0,4439	12	3,927083	0,346863	12
14 dias	4,07845	0,415427	12	4,05685	0,478569	12
17 dias	4,096842	0,300301	12	4,287175	0,503146	12
20 dias	3,840658	0,297738	12	3,960167	0,342803	12
23 dias	3,851798	0,321631	12	3,901308	0,736421	12
26 dias	3,579442	0,695579	12	3,888875	0,482306	12

APÊNDICE 1 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DADOS DE CORAÇÃO ISOLADO

PRESSÃO NORMALIZADA			
GRUPO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	N
Controle	176,867	42,1911	8
DM	146,0453	37,05386	8

dP/dt_{máx} NORMALIZADO			
GRUPO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	N
Controle	13,94872	2,615907	8
DM	12,38354	2,009887	8

dP/dt_{min} NORMALIZADO			
GRUPO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	N
Controle	-9,69148	2,1595	8
DM	-7,94649	0,849575	8

ANEXOS

ANEXO 1 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL	78
------------------------------------------------------------------------------	----



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 Setor de Ciências Biológicas
 Comissão de Ética no Uso de Animais
 (CEUA)



Nº 816 B

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.


PROCESSO/PROCESS: 23075.021654/2014-11

APROVADO/APPROVAL: 05/08/2014 RO 06/2014
 Alteração aprovada em: 10/03/2015 – R.O. 02/2015

TÍTULO/TITLE: Efeitos do diabetes mellitus experimental sobre as alterações temporais da variabilidade da frequência cardíaca

AUTORES/AUTHORS: Fernando Augusto Lavezzo Dias, Angela Mara Rambo, Rosalvo T.H. Fogaça, Andrielle Elaine Capote

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Fisiologia


 Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
 Coordenador da CEUA