

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM MEDICINA**

Oscar Albuquerque de Moraes

**AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO AUTONÔMICA CARDIOVASCULAR DE
CAMUNDONGOS DIABÉTICOS NÃO OBESOS.**

São Paulo

2013

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM MEDICINA**

Oscar Albuquerque de Moraes

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO AUTONÔMICA CARDIOVASCULAR DE
CAMUNDONGOS DIABÉTICO NÃO OBESO (NOD).**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Medicina da Universidade
Nove de Julho, para obtenção do título de
Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Claudia Costa Irigoyen

São Paulo

2013

Moraes, Oscar Albuquerque de.

Avaliação da modulação autonômica cardiovascular de camundongos diabéticos não obesos./ Oscar Albuquerque de Moraes. 2013
63 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2013.

Orientador (a): Prof.^a Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen.

1. Diabetes mellitus. 2. Sistema nervoso autônomo. 3. Barorreflexo.

I. Irigoyen, Maria Claudia Costa. II. Título

CDU 616

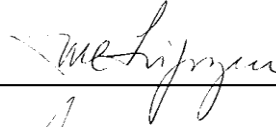
São Paulo, 10 de dezembro de 2013.

TERMO DE APROVAÇÃO

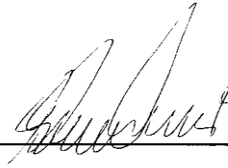
Aluno(a): **Oscar Albuquerque de Moraes**

Título da Dissertação: "Avaliação da Função autonômica cardiovascular de camundongos não obesos diabéticos (Nod)"

Presidente: PROFA. DRA. Maria Cláudia Costa Irigoyen



Membro: PROF. DR. Bruno Rodrigues



Membro: PROFA. DRA. KATIA DE ANGELIS



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Sílvia e a minha companheira de longa jornada Kátia, por todo incentivo no meu potencial e por sempre acreditar no conhecimento. Sem vocês eu não seria capaz de trilhar caminhos que apenas estavam na minha imaginação.

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos:

A minha orientadora Prof^a. Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen, por ter me recebido em seu laboratório de braços abertos, pelo apoio científico e emocional.

A Prof^a. Dra. Kátia De Angelis, pelos ensinamentos e toda atenção no decorrer desse período.

Ao Prof. Dr. Cristiano Mostarda, pela paciência e pelo tempo dispendido me passando conhecimento, pelas análises de dados e ideias compartilhadas, o que me leva a acreditar nessa parceria de trabalho e amizade e ter certeza que novos trabalhos virão.

A Isabel Cristina Lameirinhas, que foi a irmã que eu nunca tive, me ajudando nas questões técnico administrativas, mas principalmente me mostrando como ser uma pessoa justa em um meio tão competitivo.

Aos técnicos, Édson, Leandro e Maikon, pelo cuidado com os animais de experimentação e pela amizade e bom humor com que sempre me trataram.

Aos colegas de laboratório do InCor, Jacqueline, Fernando, Michelle, Janaina, Emerson, Pamella, Cavinato, Ademir e Naomi, pela amizade e companhia sempre gratificantes.

Aos colegas da Uninove, Hugo, Morgana, Fernando, Tayguara, Janaina, Danielle, Filipe, Nathalia, Guilherme, pelos momentos compartilhados.

A todos aqueles que por ventura esqueci-me de citar aqui, mas que fazem parte da minha vida e estarão sempre no meu coração.

“Podemos facilmente perdoar uma criança que tem medo do escuro; a real tragédia da vida é quando os homens têm medo da luz.”

PLATÃO

RESUMO

Introdução: O diabetes está associado com disfunção autonômica e esta é uma grave complicação que eleva o risco de mortalidade cardiovascular. O camundongo não obeso diabético (NOD) é um modelo experimental de diabetes tipo 1 que desenvolve insulinite na quarta semana de vida e diabetes entre a 14^a e 20^a semana de vida. Contudo, dados sobre a função autonômica cardiovascular em camundongos NOD permanecem escassos. **Objetivos:** Investigar a função autonômica cardiovascular do camundongo NOD. **Métodos:** Camundongos fêmeas (24-28 semanas de vida) foram divididas em dois grupos: NOD (n = 6) e controle (C, camundongo suíço, n=6). Foram incluídos no grupo NOD animais com glicemia igual ou superior a 300 mg/dl. Foi avaliada a variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e da frequência e também por meio de análise simbólica. Além disso, foram avaliados a variabilidade da pressão arterial, bem como a sensibilidade barorreflexa, por meio das respostas bradicárdicas e taquicárdicas induzidas pela infusão de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes e o coeficiente de correlação de Pearson. Os dados foram descritos como média e erro padrão. **Resultados:** A frequência cardíaca e a pressão arterial foram similares entre os grupos, no entanto a variabilidade da frequência cardíaca (variância do intervalo de pulso: NOD = $21,07 \pm 3,75$ vs. C = $42,02 \pm 6,54$ ms²) e o RMSSD (NOD = $4,01 \pm 0,32$ vs. C = $8,28 \pm 0,97$ ms), um índice de modulação vagal, foram menores no grupo NOD quando comparados ao grupo controle. Além disso, o componente de baixa frequência foi maior no grupo NOD (BF normalizado: NOD = $61,0 \pm 4,0$ vs. C = $20,0 \pm 4,0\%$), enquanto que o componente de alta frequência foi menor no grupo NOD quando comparado com o grupo controle (AF normalizado: NOD = $39,0 \pm 4,0\%$ vs. C = $80,0 \pm 4,0\%$). De forma semelhante, na análise simbólica o padrão 0V, indicativo da atividade simpática, estava aumentado no grupo NOD em comparação com o grupo controle (NOD = $11,9 \pm 1,4$ vs. C = $6,06 \pm 0,90\%$) e o padrão 2LV, indicativo da atividade parassimpática, estava reduzido no grupo NOD (NOD = $7,98 \pm 1,3$ vs. C = $21,2 \pm 3,36\%$). Ambas as respostas reflexas comandadas pelos barorreceptores, taquicárdica (NOD = $3,01 \pm 0,72$ vs. C = $4,54 \pm 0,36$ bpm/mmHg) e bradicárdica (NOD = $2,49 \pm 0,31$ vs. C = $3,43 \pm 0,33$ bpm/mmHg) foram menores no grupo NOD quando

comparadas com o grupo controle. Ainda, observamos uma correlação negativa entre os índices de modulação vagal (RMSSD, componente de alta frequência normalizado e padrão 2LV da análise simbólica) e os níveis glicêmicos. **Conclusão:** Os camundongos NOD apresentam disfunção autonômica cardiovascular e essa disautonomia está associada com os níveis glicêmicos.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus. Sistema Nervoso Autônomo. Barorreflexo. Camundongo NOD.

ABSTRACT

Introduction: It is known that diabetes is associated with autonomic dysfunction and this is a severe complication that increases the risk of cardiovascular mortality. The non-obese diabetic mice (NOD) is an experimental model of type 1 diabetes which develops insulinitis at the 4th week and diabetes between the 14th and the 20th week of life. However, data about autonomic function in these mice remain scarce. **Objective:** To investigate the cardiovascular autonomic profile of NOD mice. **Methods:** Female mice (24-28 week old) were divided in two groups: NOD (n=6) and control (n=6, swiss mice). NOD mice with glycemia ≥ 300 mg/dl were used in this study. Heart rate variability (HRV) was evaluated in time and frequency domains and also through symbolic analysis. Were also analyzed the variability of the blood pressure, and baroreflex sensitivity by means of the bradycardic and tachycardic responses induced by infusion of phenylephrine and sodium nitroprusside. Student t test for independent samples and Pearson's correlation coefficient were used for statistical analyses. The data were described as means and standard error. **Results:** The heart rate and arterial pressure were similar between the groups, however HRV (total variance of RR interval: NOD = 21.07 ± 3.75 vs. C = 42.02 ± 6.54 ms²) and RMSSD (NOD = 4.01 ± 0.32 vs. C = 8.28 ± 0.97 ms), a vagal modulation index, were lower in NOD group when compared to control group. Moreover, the low frequency component was higher in NOD group (normalized LF: NOD = 61.0 ± 4.0 vs. C = $20.0 \pm 4.0\%$), while the high frequency of HR component was lower in NOD compared with the control group (normalized HF: NOD = $39.0 \pm 4.0\%$ vs. C = $80.0 \pm 4.0\%$). Similarly, the 0V pattern of symbolic analysis, indicative of sympathetic activity, was increased in NOD group when compared to the control group (NOD = 11.9 ± 1.4 vs. C = $6.06 \pm 0.90\%$) and the 2LV pattern, indicative of parasympathetic activity, was reduced in the NOD group (NOD = 7.98 ± 1.3 vs. C = $21.2 \pm 3.36\%$). Both responses to arterial pressure changes, tachycardic (NOD = 3.01 ± 0.72 vs. C = 4.54 ± 0.36 bpm/mmHg) and bradycardic (NOD = 2.49 ± 0.31 vs. C = 3.43 ± 0.33 bpm/mmHg) were lower in NOD when

compared to the control group. A negative correlation between the indices of vagal modulation (RMSSD, normalized high frequency component and 2LV pattern via symbolic analysis) and blood glucose levels was also observed. **Conclusions:** The NOD mice present cardiovascular autonomic dysfunction and that is probably associated with glycemic levels.

Key-Words: Diabetes Mellitus. Autonomic Nervous System. Baroreflex. Mice, Inbred NOD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo desenvolvido por Mahaffy e Edelstein-Keshet. Morte celular programada de células beta pancreáticas gerando peptídeo auto-antígeno	2
Figura 2. Fotos ilustrativas da canulação da artéria carótida e veia jugular em camundongo.	15
Figura 3. Ilustração do registro direto da pressão arterial.	16
Figura 4. Frequência cardíaca dos grupos controle e NOD.....	19
Figura 5. Sensibilidade barorreflexa avaliada pelas respostas taquicárdicas e bradicárdicas grupos controle e NOD.	20
Figura 6. Variância do intervalo de pulso dos grupos controle e NOD.	22
Figura 7. RMSSD dos grupos controle e NOD..	22
Figura 8. Componente normalizado de baixa frequência do intervalo de pulso dos grupos controle e NOD.....	23
Figura 9. Componente normalizado de alta frequência do intervalo de pulso dos grupos controle e NOD.....	23
Figura 10. Balanço simpatovagal dos grupos controle e NOD..	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pressão arterial e frequência cardíaca nos grupos controle e NOD.	32
Tabela 2. Variabilidade da frequência cardíaca nos grupos controle e NOD.....	34
Tabela 3. Variabilidade da pressão arterial nos grupos controle e NOD.....	37
Tabela 4. Análise simbólica da variabilidade da frequência cardíaca dos grupos controle e NOD.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

AF IP	Componente de alta frequência do intervalo de pulso
AF IP nu	Componente normalizado de alta frequência do intervalo de pulso
BB	Bio breeding
BF IP	Componente de baixa frequência do intervalo de pulso
BF IP nu	Componente normalizado de baixa frequência do intervalo de pulso
BF PAS	Componente de baixa frequência da pressão arterial sistólica
BF/AF	Balanço simpátovagal
bpm	Batimentos por minuto
dL	Decilitro
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
FC	Frequência cardíaca
GLUT2	Transportador de glicose tipo 2
HLA	Complexo de antígeno de leucócitos humanos
Hz	Hertz
IBR	Índice de bradicardia reflexa
ICA	Anticorpo anti célula da ilhota
IP	Intervalo de pulso
ITR	Índice de taquicardia reflexa
kg	Quilograma
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mmHg	Milímetros de mercúrio
mmol	Milimolar

NAC	Neuropatia autonômica cardiovascular
NOD	Não obeso diabético
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
RMSSD	Raiz quadrada da soma dos quadrados das diferenças sucessivas entre intervalos R-R
STZ	Estreptozotocina
VAR IP	Variância do intervalo de pulso
VAR PAS	Variância da pressão arterial sistólica
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Diabetes	1
1.2 Neuropatia autonômica cardiovascular	5
1.3 Camundongo não obeso diabetico (NOD).....	8
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVO	13
3.1 Objetivos específicos	13
4. MÉTODOS	14
4.1 Animais e grupos	14
4.2 Mensuração dos níveis glicêmicos.....	14
4.3 Canulação.....	14
4.4 Registro direto dos sinais de pressão arterial.....	15
4.5 Avaliação da sensibilidade do barorreflexo.....	16
4.6 Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial.....	17
4.7 Análise simbólica.....	17
4.8 Análise estatística	18
5. RESULTADOS	19
5.1 Pressão Arterial e Frequência cardíaca.....	119
5.2 Sensibilidade Barorreflexa.....	20
5.3 Modulação autonômica cardiovascular	20
5.4 Correlações	25
6. DISCUSSÃO	26
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
8. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes

Classificação e fisiopatologia do diabetes mellitus tipo 1

O diabetes é uma síndrome metabólica crônica, caracterizada por um estado de hiperglicemia, podendo ser resultante de uma deficiência na produção de insulina, uma resistência dos tecidos à ação destes hormônios ou ambos os fatores. Além disso a hiperglicemia crônica do diabetes é associada com danos ao longo do desenvolvimento da doença levando a disfunções em diferentes órgãos especialmente em olhos, rins, nervos e coração (ALBERTI; ZIMMET, 1988; ADA, 2010).

Outra forma de classificação do DM é relatada a sua etiologia e nos mecanismos desencadeantes desta patologia, sendo dividida em diabetes tipo 1 (DM1) (autoimune ou idiopática) e diabetes tipo 2 (DM2), relacionada ao estilo de vida. (ALBERTI; ZIMMET, 1998).

O DM 2 é também chamado de diabetes não insulino dependente ou diabetes do adulto e corresponde a 90% dos casos de diabetes. Ocorre geralmente em pessoas obesas com mais de 40 anos de idade, embora na atualidade também ocorra com maior frequência em jovens, em virtude de maus hábitos alimentares, sedentarismo e estresse da vida urbana. Nesse tipo de obesidade a insulina está presente, porém sua ação é dificultada pela obesidade, o que é conhecido como resistência insulínica, uma das causas da hiperglicemia (SBD, 2009).

Outra forma de diabetes que ocorre em menor proporção é a DM1, que representa de 5 a 10% dos casos de diabetes. Esse tipo de diabetes leva à deficiência absoluta de insulina como resultado de uma destruição autoimune das células beta do pâncreas (ADA, 2005).

Dessa forma, a primeira evidência reconhecida quanto à origem autoimune do DM1, foi descrita por Bottazzo, Florin-Christensen e Doniach (1974), que observaram a presença de auto anticorpos circulantes órgão específico, chamados anticorpos anti-células da ilhota (ICA) em pacientes com DM1.

No sistema dos mamíferos cada célula nucleada possui marcadores específicos expressas na superfície de cada célula, que ajudam na sua identificação como constituintes de seu próprio sistema. Um grupo de genes conhecidos como complexo principal de histocompatibilidade é responsável pela produção destas moléculas marcadoras. Em humanos este sistema é conhecido como complexo de antígeno de leucócitos humanos (HLA). Duas regiões cromossômicas no genoma humano surgiram como consistente e significativa evidência de uma associação com DM1. Estes são o HLA no braço curto do cromossomo 6 (locus 6p 21.3) e a região do gene da insulina no cromossomo 11 (locus 11p 15). O modelo desenvolvido por Mahaffy e Edelstein-Keshet (2007), mostra a cascata de eventos que podem levar ao DM1.

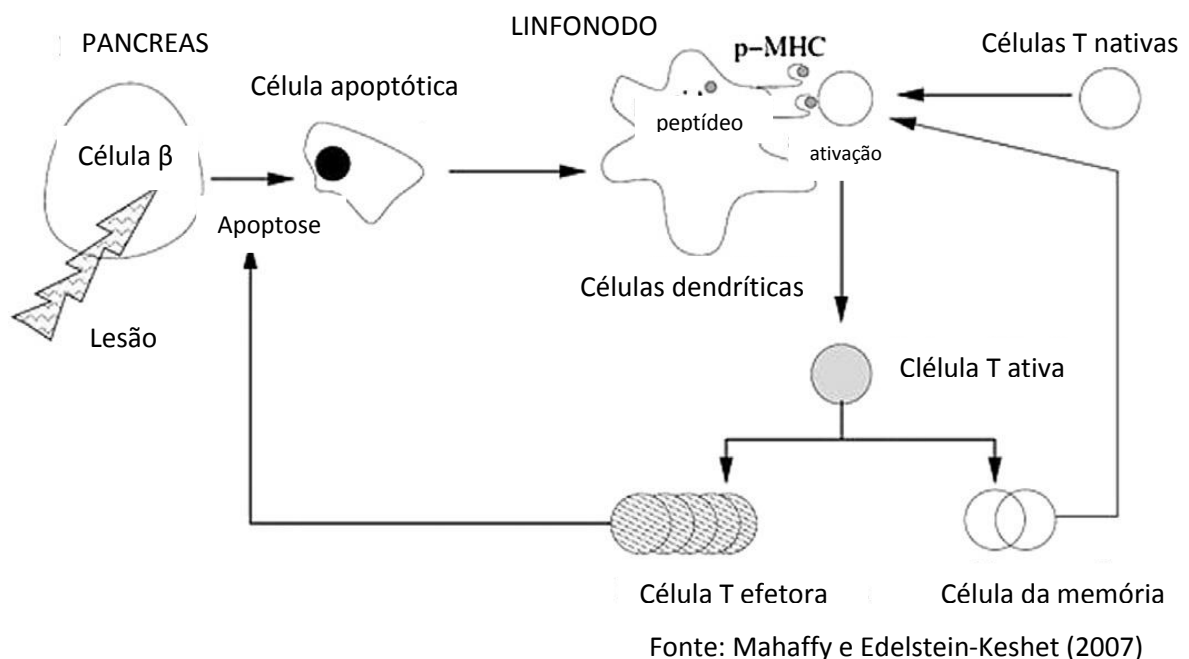


Figura 1. Modelo desenvolvido por Mahaffy e Edelstein-Keshet. Morte celular programada de células beta pancreáticas gerando peptídeo auto antígeno.

O modelo indica que qualquer dano à célula beta produtora de insulina pode levar a ativação de células T contra auto antígenos do sistema humano. As células beta danificadas sofrem apoptose e produzem peptídeo auto antígeno. Nos gânglios pancreáticos, este peptídeo é apresentado nas células dendríticas apresentadoras de antígeno. As células T nativas entram em contato com esses antígenos e falham em reconhecer isso como uma auto proteína e se diferenciam para reconhecer estas proteínas como antígenos estranhos. Uma fração de células T diferenciadas permanece

como células da memória, enquanto outra fração participa ativamente da defesa (células T citotóxicas), levando ao DM1 (MAHAFFY; EDELSTEIN-KESHET, 2007).

Estudos epidemiológicos tem demonstrado que alguns fatores ambientais também podem influenciar no desenvolvimento do DM1. Entre outros fatores ambientais, a exposição a algumas substâncias antigênicas no início da vida parecem contribuir para o desenvolvimento de doenças. Alguns ingredientes da dieta, como a albumina do soro bovino, beta caseína e glúten são apontados como fatores causadores de DM1. A beta-caseína e a albumina do soro do leite bovino parecem atuar via geração de linfócito T que atacam especificamente a molécula transportadora de glicose específica da célula beta (GLUT 2) (POZZILLI, 1998). O glúten não dissolvido provoca inflamação subclínica da mucosa intestinal o que aumenta a porcentagem de células T agressivas. O estado funcional das células beta também desempenha um papel importante na patogênese do DM1, e a ingestão de alimentos com altos índices glicêmicos aumenta a demanda de insulina e obriga a célula beta a produzir mais insulina, o que acelera sua destruição (BUSCHARD, 2011). Essa observação pode ser referida à hipótese do acelerador, que afirma que o aumento do ganho de peso em jovens pode acelerar o desenvolvimento do DM1 (BUSCHARD, 2011). Outra hipótese formulada por Strachan, afirma que a autoimunidade é mais comum em um ambiente limpo e a exposição a doenças infecciosas na infância poderia reduzir a incidência de DM1. Também é sugerido que a proteção contra a DM1 é fornecida a partir da imunidade-inata, especificamente a ativação das células T natural killer. Essa teoria é baseada no fato que as células natural killer estão reduzidas em seres humanos afetados por DM1 (VAN DER VLIET et al., 2001).

O que caracteriza o DM1 é a destruição total ou parcial das células beta das ilhotas de Langerhans pancreáticas, que resulta na incapacidade progressiva de produzir insulina; esse processo pode levar meses ou anos, mas geralmente só aparece clinicamente após a destruição de pelo menos 80% da massa de ilhotas (DEVENDRA; LIU; EISENBARTH, 2004).

A presença de infiltrado inflamatório do tipo linfomononuclear e a ausência de células secretoras de insulina, as células beta, caracteriza o quadro histológico do DM1. As células secretoras de outros hormônios, como glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático, também presentes nas ilhotas pancreáticas são poupadas, porém como as células que secretam insulina são em maior número as ilhotas

pancreáticas acabam se tornando atrofiadas. O processo de destruição das células β -pancreáticas, denominado insulite, ocorre pela agressão imunológica mediada por células linfocitárias, macrófagos e células “natural killer”, sendo portanto um processo dependente da imunidade celular (FOULIS et al., 1986).

Considerada como uma das doenças crônicas mais comuns em crianças e adultos jovens, o DM1 pode se desenvolver em qualquer faixa etária, mais frequente em jovens com menos de 20 anos de idade. Em geral a taxa de incidência atinge pico entre 10 a 14 anos (LIU; EISENBARTH, 2002) e declina após a puberdade, estabilizando em jovens adultos por volta dos 15 a 29 anos de idade (EISENBARTH, 1986; GROUP, 2006; VANDEWALLE et al., 1997).

Dados Epidemiológicos

A incidência do DM1 é o resultado de uma interação dos fatores ambientais e genéticos, que somados podem desencadear o início da doença. Dessa forma, observam-se variações de incidência e prevalência em diferentes regiões do mundo (EISENBARTH, 1986).

Nesse sentido, em 1990 o projeto DiaMond foi iniciado pela Organização Mundial da Saúde para abordar as implicações de saúde pública de DM1 e descrever a incidência de DM1 em crianças. Um relatório inicial, em 2000, descreveu a incidência de DM1 em crianças de 14 anos de idade em 50 países em todo o mundo, totalizando 19.164 casos de uma população de 75,1 milhões de crianças (cerca de 4,5% da população mundial nessa faixa etária) (KARVONEN et al., 2000). A menor incidência (<1/100, 000 por ano) foi relatada nas populações da China e da América do Sul e maior incidência (> 20/100, 000 por ano) foi relatada na Finlândia, Suécia, Noruega, Portugal, Reino Unido, Canadá e Nova Zelândia (KARVONEN et al., 2000).

Nos Estados Unidos, o estudo SEARCH for Diabetes Youth, foi projetado com o objetivo de estimar a incidência e prevalência de diabetes, entre os indivíduos com menos de 20 anos de idade, por idade, sexo, raça e etnia. De 2002 a 2003, em mais de 10 milhões de pessoas avaliadas, foram diagnosticados 1905 casos de DM1, sendo que as taxas de incidência foram maiores em brancos não hispânicos quando comparados com outras etnias e ligeiramente maior no sexo feminino (DABELEA et al., 2007). Esse estudo ainda aponta a distribuição da taxa de incidência de DM1 em 2002-2003 dividida

por faixa etária, sendo: 0 a 4 anos: 13,3; 5 a 9 anos: 22,1; 10 a 14 anos: 25,9; e 15 a 19 anos: 13,1.

Atualmente existem 3 milhões de americanos portadores de DM1 e a cada ano 15000 crianças e adultos são diagnosticados com essa doença. Isso equivale a 80 pessoas diagnosticadas com essa doença diariamente. Outro dado importante é que a incidência vem aumentando nos últimos anos, sendo que entre 2001 e 2009 houve um aumento de 23% nos americanos com menos de 21 anos de idade. Com a incidência da doença aumentando, os gastos públicos somam atualmente 14,9 bilhões de dólares somente nos Estados Unidos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2011).

Segundo a Associação Americana de Diabetes (2003), os sintomas da hiperglicemia acentuada incluem poliúria, polidipsia, perda de peso às vezes com polifagia e visão desfocada. Devido a essas alterações resultantes da hiperglicemia o paciente diabético apresenta um aumento do risco de vida. Além disso, outros sintomas como cetoacidose ou síndrome hiperosmolar não cetótica também estão presentes.

O diabetes apresenta uma relação para o aumento do risco de mortalidade cardiovascular além da associação com múltiplos sintomas e prejuízos funcionais. É característico da doença a presença de anormalidades estruturais de nervos, vasos sanguíneos, rins, e retina, devido a complicações que ocorrem ao longo do tempo devido ao mau controle glicêmico (UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP, 1998; DE ANGELIS; IRIGOYEN; MORRIS, 2009). As complicações a longo prazo do diabetes incluem retinopatia com potencial perda de visão, nefropatia levando à insuficiência renal, neuropatia periférica com risco de úlceras nos pés, amputações não traumáticas e neuropatia autonômica causando sintomas cardiovasculares.

1.2 Neuropatia autonômica cardiovascular

A neuropatia autonômica diabética (NAC) envolve todo sistema autonômico e é uma complicação comum do diabetes, sendo um dos subtipos de neuropatia autonômica diabética (YANG; CHON, 2011). A NAC causa sérias complicações, tanto no controle da frequência cardíaca como no controle dinâmico periférico vascular (VIRAG et al., 1999).

A doença é decorrente de alterações das fibras autonômicas que inervam o coração e os vasos e suas principais manifestações clínicas incluem, taquicardia de repouso, intolerância ao exercício, hipotensão ortostática, função neuro vegetativa prejudicada, e desequilíbrio autonômico (SCHMIDT, 2003), resultando em aumento do risco de mortalidade e redução da qualidade de vida nas pessoas com diabetes (VIRAG et al., 1999).

Tanto os neurônios simpáticos quanto os parassimpáticos podem ser afetados pela neuropatia diabética resultando em alterações no controle da frequência cardíaca e da dinâmica vascular (SCHUMER et al., 1998).

A NAC é a forma mais estudada e clinicamente importante dentre as neuropatias diabéticas. Estudos demonstraram que a disfunção autonômica cardiovascular, medida através da variabilidade da frequência cardíaca, está associada a um aumento do risco (duas vezes maior) de isquemia miocárdica silenciosa e mortalidade (EWING et al., 1985; SAWICKI et al., 1998).

Outro estudo avaliando a variabilidade da frequência cardíaca no diabetes observou que as alterações na função autonômica estão presentes precocemente no desenvolvimento do diabetes e que o diabetes leva a progressivo declínio na função autonômica (SCHROEDER et al., 2005).

No clássico trabalho de Jean Pirart (1977), foi relatado o comprometimento do sistema nervoso no DM. Nesse estudo, com período de seguimento prospectivo de 25 anos, observou-se uma prevalência de alterações no sistema nervoso em 50% dos pacientes.

O sistema nervoso autônomo é fundamental na regulação da função da maior parte dos sistemas ou órgãos no organismo, por isso seu comprometimento pode ocasionar graves alterações nas funções cardiovasculares, alterando a função desse sistema vital (ZIEGLER, 1992). Também, a NAC parece estar relacionada com o aumento da mortalidade em pacientes diabéticos (VINIK; ZIEGLER, 2007). De forma semelhante, Ewing, Campbell e Clarke (1980) observaram que pacientes diabéticos com reflexos cardiovasculares normais têm menor mortalidade quando comparados àqueles que apresentam algum tipo de prejuízo na função reflexa autonômica.

Dessa forma, as disfunções autonômicas decorrentes do diabetes acabam por induzir disfunções cardiovasculares importantes, tais como alterações na pressão

arterial, na frequência cardíaca de repouso, no reflexo dos pressoreceptores e no controle autonômico da frequência cardíaca (DE ANGELIS et al., 2000).

No entanto, tanto a frequência cardíaca como a pressão arterial não fornecem de forma precisa as informações a respeito da função autonômica. Para isso, é necessária a avaliação das interações entre as diferentes alças do sistema nervoso autônomo no diabetes, como a quantificação de marcadores da função autonômica pelo uso de métodos que permitam avaliar a variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial, as respostas ao bloqueio autonômico induzidas por fármacos, as alterações funcionais no barorreflexo e quimiorreflexo, como também as alterações da estrutura dos órgãos acometidos (DE ANGELIS et al., 2007).

A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) pode ser utilizada para acessar a função autonômica em várias situações fisiológicas e patológicas, bem como em sujeitos com diabetes. A VFC é um indicador das influências simpáticas e parassimpáticas (vagal) na modulação da frequência cardíaca (DAVIES; NEILSON, 1967).

Interações entre as atividades dos nervos simpáticos e parassimpáticos são essenciais na regulação da função cardiovascular. A hiperatividade simpática está associada a aumento do risco de vida e taquicardia ventricular, enquanto o aumento do tônus vagal parece exercer um efeito protetor e anti-fibrilatório (MALIK et al., 1996).

É amplamente conhecido que a neuropatia promove uma redução da variabilidade da frequência cardíaca, tanto no domínio do tempo como no domínio da frequência, evidenciada por alterações nos componentes de alta e baixa frequência. Ademais, está bem estabelecido que a variabilidade da frequência cardíaca é um importante marcador prognóstico de mortalidade (MALIK et al. 1996).

Modificações da variabilidade podem ser detectadas mesmo que não se observem alterações da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) basais. Por exemplo, a redução da variabilidade da FC está associada a um aumento do risco de morte súbita em pacientes com insuficiência cardíaca crônica (FARAH et al., 2006).

Nesse sentido Fazan e colaboradores (1999), observaram uma significativa diminuição da variabilidade da FC, avaliada por análise espectral, mesmo na ausência de outras manifestações nos parâmetros cardiovasculares em ratos diabéticos por estreptozotocina.

Além do mais, o controle barorreflexo da circulação é um dos mais importantes mecanismos de controle momento a momento da pressão arterial. Sendo que, o controle da variabilidade da pressão arterial pelo barorreflexo é a chave para a homeostase fisiológica. Isso pode ser visto em estudos que mostraram que o prejuízo da função barorreflexa é um fator de risco independente para morte súbita pós-infarto do miocárdio (LA ROVERE et al. 1998).

Estudos têm demonstrado que a atividade dos barorreceptores pode modular tanto a atividade simpática como a parassimpática para vasos e coração, indicando que alterações nas vias aferentes e/ou eferentes do barorreflexo podem estar diferencialmente envolvidas na disfunção autonômica do diabetes. Cronicamente, a bradicardia reflexa também se mostra alterada, comprometendo assim as duas alças barorreflexas (TOMLINSON et al., 1981; DE ANGELIS et al., 2002; HARTHMANN et al., 2007).

A disfunção barorreflexa tem sido atribuída a alterações no parassimpático cardíaco, embora alterações na função do receptor, ou mesmo na mediação central do reflexo, não possam ser excluídas (DALL'AGO et al. 1997; MAEDA et al., 1995).

Nosso grupo tem demonstrado várias alterações autonômicas, hemodinâmicas e funcionais cardíacas promovidas pelo diabetes experimental, resultando em aumento da mortalidade (MAEDA et al., 1995; DALL'AGO et al., 2002; SCHAAN et al., 2004; WICHI et al., 2007), assim como o papel protetor do treinamento físico (MOSTARDA et al., 2009; SILVA et al., 2012; DA PUREZA et al., 2012; RODRIGUES, B. et al., 2012).

1.3 Camundongo não obeso diabético (NOD)

Uma extensa pesquisa no campo do diabetes nas últimas quatro décadas resultou em uma série de modelos animais de diabetes mellitus tipo1 utilizados para pesquisa. No entanto, um modelo perfeito ainda precisa ser encontrado (ACHARJEE et al., 2013).

O camundongo NOD é um modelo de doença espontânea autoimune, órgão-específica estudado em todo o mundo. Estes camundongos foram produzidos em 1974, no Laboratório de Investigações Shinogui, em Osaka – Japão. Possuem fenótipo albino

e são procedentes de uma derivação da sub linhagem Jc 1 – ICR “outbread” que desenvolvia catarata (LEITER, 2001).

De acordo com o Laboratório Jackson, na 6^o geração os progenitores dos futuros NOD/Shi foram acasalados “inbred” com camundongos livres de catarata, mas com níveis elevados de glicemia de jejum. A partir da 13^o geração, a base para a seleção foram os níveis plasmáticos de glicose elevados. Em 1974, na 20^o geração uma fêmea normoglicêmica desenvolveu espontaneamente DM, com depleção de insulina sérica e insulite. A reprodução seletiva da linhagem produziu a linhagem NOD (LEITER, 1993b). No Brasil, a colônia foi introduzida e implantada na Universidade Estadual de Campinas a partir de colônias matrizes provenientes do Laboratório INSERM U-25 Neker, Paris, França (PAVIN; ZOLLNER, 1994).

O desenvolvimento de dois modelos de roedores (não obeso diabético) NOD e (Bio Breeding) BB, que expressam de forma espontânea a DM1, permitiu a exploração mais detalhada do estudo das células do sistema imune, que fundamenta a destruição de uma célula β pancreática (ATKINSON; LEITER, 1999).

O modelo NOD tornou-se interessante no meio científico para o estudo do DM-1 por possuir um genoma mais bem definido e maior número de reagentes monoclonais para análise. Além disso, esse modelo apresenta um baixo custo em comparação a outros animais, como o rato que expressa diabetes por meio de Aloxano ou Estreptozotocina, conhecidos como modelos experimentais farmacológicos para o estudo do diabetes (SCHMIDT et al., 2003).

Contudo, a qualidade do ambiente de criação e manutenção dos camundongos NOD não é uma questão trivial. Embora exista apenas uma evidência circunstancial apoiando causas ambientais como gatilho da DM1 em seres humanos (por exemplo, ingredientes alimentares e patógenos), estudos utilizando o camundongo NOD demonstraram claramente que a penetrância do genótipo susceptível a diabetes é fortemente modificada pela população microbiana do ambiente e também pela dieta ofertada aos animais (KIKUTANI; MAKINO, 1992).

O camundongo NOD tem proporcionado pesquisas com mais evidências convincentes de que os fatores ambientais são importantes moduladores da susceptibilidade genética para DM1. No período de 30 semanas de idade a incidência de diabetes nas fêmeas é de 80% ou superior, enquanto que no sexo masculino, a

incidência é muito variável entre as colônias, variando de 0 a 100% em diferentes instituições (LEITER, 1990).

Como citado anteriormente, no modelo NOD ocorre dimorfismo sexual quanto à frequência do DM espontâneo, com prevalência do diabetes entre 70-90% em fêmeas e 20% em machos (MAKINO et al., 1980). Esse dimorfismo de gênero parece ser controlado também pelos esteroides sexuais das gônadas. A gonadectomia realizada na quinta semanas de vida aumenta acentuadamente o desenvolvimento do diabetes em NOD/ machos enquanto que deprime a incidência em fêmeas (MAKINO et al., 1981).

Estes camundongos apresentam autoimunidade espontânea que causa diabetes através da destruição das células produtoras de insulina, de forma semelhante à observada em humanos (KODAMA et al., 2003).

A destruição das células produtoras de insulina é caracterizada por insulite, infiltrado leucocitário nas ilhotas do pâncreas, sendo que esta infiltração é composta por células dendríticas, macrófagos, células T (CD4+ e CD8+) e células β . Os linfócitos T CD4+ possuem papel essencial no início da insulite e aparecimento do DM1, pois sabe-se que o uso de anticorpos monoclonais pode suprimir a insulite e o aparecimento do DM1 no camundongo NOD (SHIZURU et al., 1988). A proporção de células T CD8+ aumenta com a evolução da destruição das células produtoras de insulina, explicando o sinergismo entre os dois subtipos e favorecendo o aparecimento do DM1 (WONG; JANEWAY, 1997).

Esse processo descrito acima é caracterizado como sendo a fase pré-diabética: insulite. A polidipsia, poliúria, glicosúria elevada, hiperglicemia e deficiência de insulina são observadas nestes animais, acompanhados de rápida perda de peso (MAKINO et al., 1980). É um evento fundamental na fase inicial da doença, exercendo papel na patogênese de doenças autoimunes mediadas por células T, como a apresentação de auto antígenos, seguida de dano tecidual e morte por apoptose. A segunda fase é caracterizada pela destruição das células β pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina e consequente manifestação do diabetes (KIKUTANI; MAKINO, 1992).

Para Gross (2001), o infiltrado nas ilhotas é similar ao que é observado nos paciente com início recente do DM1. No entanto, de acordo com Atkinson e Leiter (1999), a insulite em pacientes diabéticos de início agudo é muito diferente das encontrada nas ilhotas de camundongos NOD.

Similarmente ao que ocorre em humanos, os camundongos NOD desenvolvem doença autoimune generalizada afetando múltiplos órgãos e tecidos, incluindo glândulas salivar e lacrimal, tireoide, adrenal e testículos (ATKINSON; LEITER, 1999).

Também de forma similar aos humanos, a diabetes nos camundongos NOD só se manifesta após o comprometimento de 95% das células beta, sendo que nem todos os animais desenvolvem diabetes, mas todos desenvolvem insulite. O início da doença é marcado por glicosúria e glicemia maior que 250 mg/dl. Muitos investigadores monitoram o camundongo NOD para desenvolvimento da glicosúria em intervalos semanais, começando após 10 semanas de idade. Perda de peso e a presença da polidipsia e poliúria indicam o aparecimento de hiperglicemia (DOI et al., 1990). Eles ainda são hipoinsulêmicos e hiperglucagênemicos, confirmando a destruição seletiva das células beta. Na maior parte das colônias os NOD sobrevivem de 3 a 4 semanas após a primeira detecção da glicosúria (LEITER, 1993).

A questão do animal controle adequado para ser utilizado na experimentação animal muitas vezes surge devido a ampla variedade de modelos NOD utilizados. Algumas linhagens puras e congênitas têm sido usadas para determinação dos parâmetros de base e são controles potenciais para as cepas NOD. No laboratório Jackson, o SWR/J providenciou um padrão adequado e inato para comparação, o SWR, derivado da linhagem ICR, modelo descoberto previamente por Serreze e Leiter em 1988. Esse modelo não apresenta deficiência imune e geneticamente é muito diferente do camundongo NOD incluindo seu complexo MHC. É utilizado como controle para funções imunes que são aberrantes no NOD (LEITER, 1993).

Em relação à função autonômica cardiovascular em camundongos NOD os dados são escassos e contraditórios. Diferentemente do que já foi observado em outros modelos experimentais de diabetes, Gross et al. (2008) observaram que em camundongos NOD fêmeas, após o aparecimento do diabetes, a frequência cardíaca estava reduzida, mas a pressão arterial manteve-se estável e a sensibilidade barorreflexa não estava prejudicada, tendo sido ao contrário maior nos NOD quando comparados aos controles. Dessa forma os autores sugeriram que a pressão arterial semelhante de camundongos não obesos diabéticos e não diabéticos exclui a existência de uma grave disfunção simpática.

2. JUSTIFICATIVA

O DM1 é responsável por cerca de 5 a 10% dos casos de diabetes, no entanto, sua incidência e prevalência continuam aumentando no mundo todo. Essa patologia está associada a uma série de implicações a curto e a longo prazo. A neuropatia autonômica é uma das principais complicações do DM e está associada a alta morbidade e mortalidade cardiovascular nessa população.

Considerando a dificuldade no estudo do DM1 em humanos, o estudo utilizando modelos animais que podem ser facilmente manipulados e testados em um ambiente controlado se torna uma alternativa eficaz. Embora os modelos animais de DM1 sejam modelos imperfeitos da doença humana, há semelhança suficiente na patogênese da DM1 que permite o estudo em camundongos.

O camundongo não obeso diabético (NOD), modelo experimental de DM1, que apresenta insulite na 4ª semana e diabetes espontâneo por volta da 14ª a 20ª semana de vida, tem algumas vantagens em relação a outros modelos, entre elas, o processo inicial da doença e a resposta imunológica que são semelhantes ao o que ocorre em humanos.

Sabe-se que o diabetes está associado à disfunção autonômica, contudo dados sobre a função autonômica cardiovascular em camundongos NOD são escassos e contraditórios. Dessa forma, torna-se importante investigar se a função autonômica cardiovascular de camundongos NOD está alterada, como observado em outros modelos experimentais de DM.

3. OBJETIVO

Avaliar a função autonômica cardiovascular de camundongos NOD.

a. Objetivos específicos

- Avaliar parâmetros hemodinâmicos (PA e FC) de camundongos NOD;
- Avaliar a sensibilidade barorreflexa de camundongos NOD;
- Avaliar a variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial de camundongos NOD.

4. MÉTODOS

4.1 Animais e grupos

Foram utilizados camundongos NOD (não obesos diabéticos) fêmeas (n=6) e camundongos suíços fêmeas (n=6, glicose sanguínea < 110 mg/dL ou < 6mmol/l) que serviram como controle. Os animais foram provenientes do biotério da Universidade Federal de São Paulo aos dois meses de idade. Todos os animais foram mantidos no laboratório de Hipertensão Experimental do Instituto do Coração durante todo o período de protocolo. Todos os procedimentos cirúrgicos, bem como o protocolo experimental utilizado, foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Nove de Julho (protocolo número AN0029-2012) e seguiram estritamente as normas para cuidados e utilização de animais de laboratório do National Institutes of Health.

4.2 Mensuração dos níveis glicêmicos

A partir da décima semana de idade os camundongos NOD tiveram seus níveis glicêmicos determinados semanalmente por meio de glicosímetro (ACCU-CHECK Sensor ® (Roche)) até atingirem o nível estabelecido de diabetes (> 300mg/dL ou > 17 mmol/l) (MARCO et al., 2008). Para tal, as amostras sanguíneas foram obtidas por punção da veia caudal.

4.3 Canulação

Quando os animais estavam com 24-28 semanas de idade o procedimento de canulação (Figura 2) foi realizado para avaliação hemodinâmica direta. Para tal, eles foram anestesiados com Ketamina (80mg/kg) e xilazina (12 mg/kg) intraperitonealmente e cânulas de polietileno (tubos Tygon de 4 cm, PE-08 conectadas a 2 cm de PE-50, Clay Adams) preenchidas com soro fisiológico heparinizado foram inseridas na artéria carótida e veia jugular para registro direto da pressão arterial e para

administração de drogas, respectivamente. As extremidades livres das cânulas foram exteriorizadas no dorso do animal, próximo à região cervical. Após a cirurgia, os animais receberam uma injeção intramuscular de penicilina G (Benzetacil ®, Fontoura-Wyeth, 60.000 U) e os cuidados pós-operatórios foram baseados na descrição de Flecknell (1992).

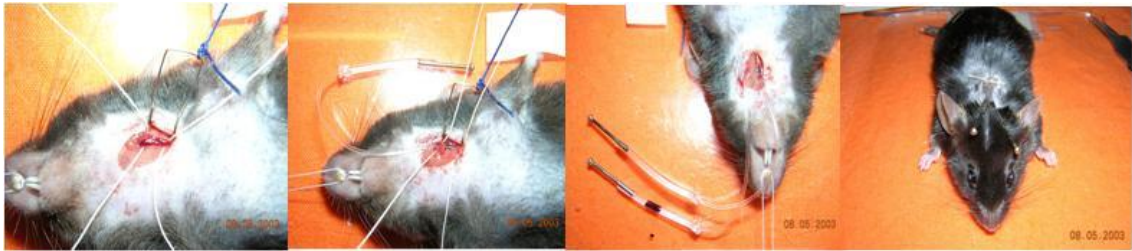


Figura 2. Fotos ilustrativas da canulação da artéria carótida e veia jugular em camundongo.

4.4 Registro direto dos sinais de pressão arterial

Dois dias após a canulação, as medidas hemodinâmicas foram realizadas. Com o animal acordado, a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal pela caixa, durante todo o período do experimento. Esta extensão foi então conectada a um transdutor (Kent Instruments, EUA) que, por sua vez, está conectado a um pré-amplificador (Stemtech BPMT-2, Quintron Instrument© Inc, EUA). Sinais de PA foram gravados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (Windaq, 4KHz, DATAQ Instruments, EUA), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 4000 Hz por canal (Figura 3), para estudo dos valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e intervalo de cada pulso de pressão.

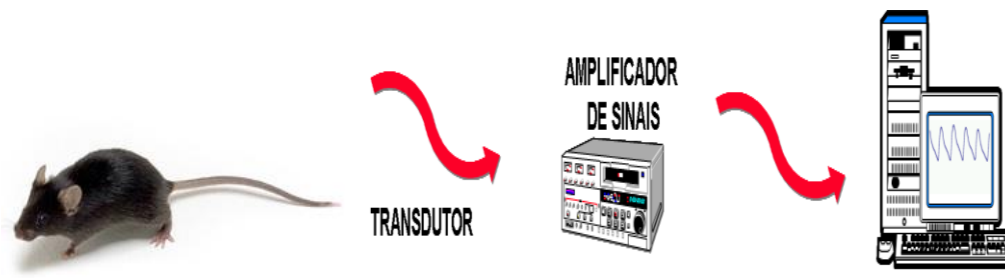


Figura 3. Ilustração do registro direto da pressão arterial.

4.5 Avaliação da sensibilidade do barorreflexo

Após o registro da PA e da FC, uma extensão de aproximadamente 20 cm (PE-10) foi conectada à cânula venosa para infusão das drogas vasoativas fenilefrina e nitroprussiato de sódio. A fenilefrina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), um potente estimulador α_1 , cuja ação predominante se dá nas arteríolas periféricas causando vasoconstrição, foi usada para provocar aumento da pressão arterial. Esse aumento da pressão arterial é seguido de bradicardia reflexa comandada pelos barorreceptores. O nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, UA), um potente vasodilatador tanto de arteríolas como de veias e cuja ação se dá por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3', 5'- guanosina monofosfato (GMP cíclico) na musculatura lisa de vasos e outros tecidos, foi usado para provocar queda da pressão arterial. Essa queda é seguida por uma resposta taquicárdica reflexa comandada pelos barorreceptores.

A sensibilidade barorreflexa foi então avaliada pelas respostas taquicárdicas e bradicárdicas mensuradas pelas variações da pressão arterial (compreendendo variações de 30 a 40 mmHg), induzidas por doses crescentes de nitroprussiato de sódio (100–250 ng/kg, intravenoso) e fenilefrina (80–250 ng/kg intravenoso), sendo que a fenilefrina e o nitroprussiato de sódio foram infundidos randomicamente entre os animais, iniciando-se a sessão com um ou outro fármaco. O maior valor injetado foi menor que 25 μ l. (DE ANGELIS et al., 2004; WICHI et al., 2007; HEEREN et al., 2009).

Para avaliação dos índices de bradicardia e taquicardia reflexa o pico máximo ou mínimo da PAM foi comparado aos valores basais. De maneira análoga, a resposta da FC às variações de PAM foi comparada com os valores de FC do período imediatamente antes da infusão das drogas. Posteriormente os índices de bradicardia e taquicardia reflexa foram obtidos pela razão entre o delta de variação da FC pelo delta de variação da PAM (FARAH et al., 1997).

4.6 Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial

A avaliação do sistema nervoso autônomo foi realizada a partir da análise das variabilidades da FC e PA nos domínios do tempo e da frequência. A análise no domínio do tempo consistiu em calcular a variância total do intervalo de pulso (IP) e da PAS. Também foi calculada, como indicador da modulação vagal no domínio do tempo, a raiz quadrada da soma dos quadrados das diferenças sucessivas entre intervalos R-R adjacentes (RMSSD). Para análise no domínio da frequência foi utilizada a transformada rápida de Fourier conforme previamente descrito (SOARES et al., 2004; HEEREN et al., 2009; ZAMO et al., 2010) e utilizada uma série do intervalo de pulso e da pressão arterial sistólica com tempo de 20 minutos. Uma janela de 256 pontos e com sobreposição de 50% foi interpolada (27 Hz) e decimada para ser igualmente espaçada no tempo. As potências para as bandas de baixa frequência (BF 0,10 – 1,0 Hz; modulação simpática) e alta frequência (AF 1 – 5 Hz; modulação parassimpática) foram calculadas por meio da integração da potência de cada banda de frequência usando uma rotina personalizada (MATLAB 6.0, Mathworks).

4.7 Análise simbólica

A análise simbólica de 3 batimentos consecutivos, que distingue a modulação cardíaca simpática e parassimpática, foi utilizada para detectar alterações na modulação autonômica da variabilidade cardiovascular (GUZZETTI et al., 2005; PORTA et al., 2007). Para isso, foi selecionada uma sequência de duração de 300 intervalos RR. Essa sequência foi distribuída em 6 níveis (0 – 5), transformando-a em uma sequência de símbolos, a partir dos quais houve construção de padrões (sequência de 3 símbolos), sendo que todos os padrões possíveis foram divididos em quatro grupos, de acordo com o número e o tipo de variação entre os símbolos subsequentes: 1) 0V: padrão sem variação (três símbolos iguais que indicam modulação simpática, por exemplo, 1,1,1); 2) 1V : padrão com uma variação (dois símbolos consecutivos iguais e outro diferente, indicando modulação simpática e parassimpática, por exemplo 3,3,2); 3) 2LV : padrão

com duas variações iguais (três símbolos formam uma rampa ascendente ou descendente, indicando modulação parassimpática, por exemplo 1,3,4); 4) 2UV : padrão com duas variações diferentes (três símbolos formando um pico ou vale, indicando modulação parassimpática, por exemplo, 4,1,2) (GUZZETTI et al., 2005). A frequência de ocorrência desses padrões foi avaliada (0V%, 1V%, 2LV%, e 2UV%).

4.8 Análise estatística

Os dados foram descritos como média e erro padrão. O teste t de Student foi utilizado para comparar as médias entre os grupos NOD e controle. A correlação de Pearson foi utilizada para testar associação entre glicemia e parâmetros autonômicos cardiovasculares. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Pressão Arterial e Frequência cardíaca

Os dados de pressão arterial e frequência cardíaca estão apresentados na tabela 1. A pressão arterial sistólica, diastólica e média dos camundongos NOD foi similar a dos animais controles. De forma semelhante, a frequência cardíaca não foi diferente entre os grupos (Figura 4).

Tabela 1. Pressão arterial e frequência cardíaca nos grupos controle e NOD

Variáveis	Controle (n =6)	NOD (n =6)	P
PAS (mmHg)	126±4,7	116±6,4	0,23
PAD (mmHg)	93±4,2	89±4,0	0,5
PAM (mmHg)	110±4,3	103±5,2	0,32
FC (bpm)	615±9	538±30	0,07

Valores apresentados como média e erro padrão obtidos pela medida direta da pressão arterial. PAS = pressão arterial sistólica, PAD = pressão arterial diastólica, PAM = pressão arterial média, FC = frequência. Teste t de Student.

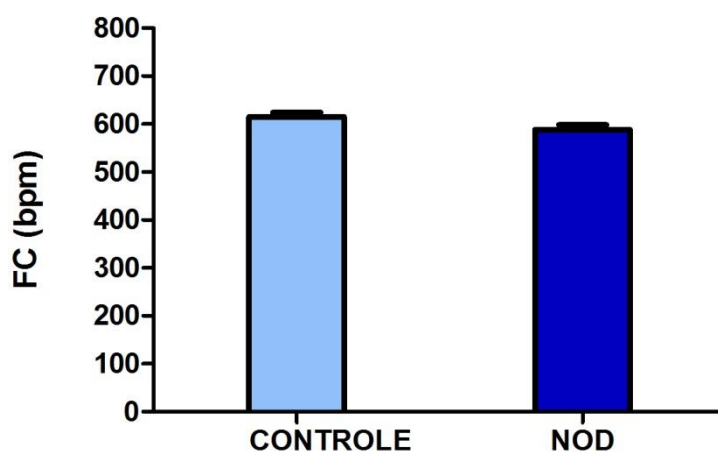


Figura 4. Frequência cardíaca dos grupos controle e NOD. FC = Frequência cardíaca. Valores apresentados como média e erro padrão.

5.2 Sensibilidade Barorreflexa

Os resultados da sensibilidade barorreflexa mostraram que o grupo NOD apresentou redução da resposta bradicárdica (NOD = $2,49 \pm 0,31$ vs. C = $3,43 \pm 0,33$ bpm/mmHg), induzida pela fenilefrina, quando comparado ao grupo controle ($p = 0,036$). Semelhantemente, a resposta taquicárdica (NOD = $3,01 \pm 0,72$ vs. C = $4,54 \pm 0,36$ bpm/mmHg), induzida pelo nitroprussiato de sódio, foi menor no grupo NOD em relação ao grupo controle ($p = 0,027$) (Figura 5).

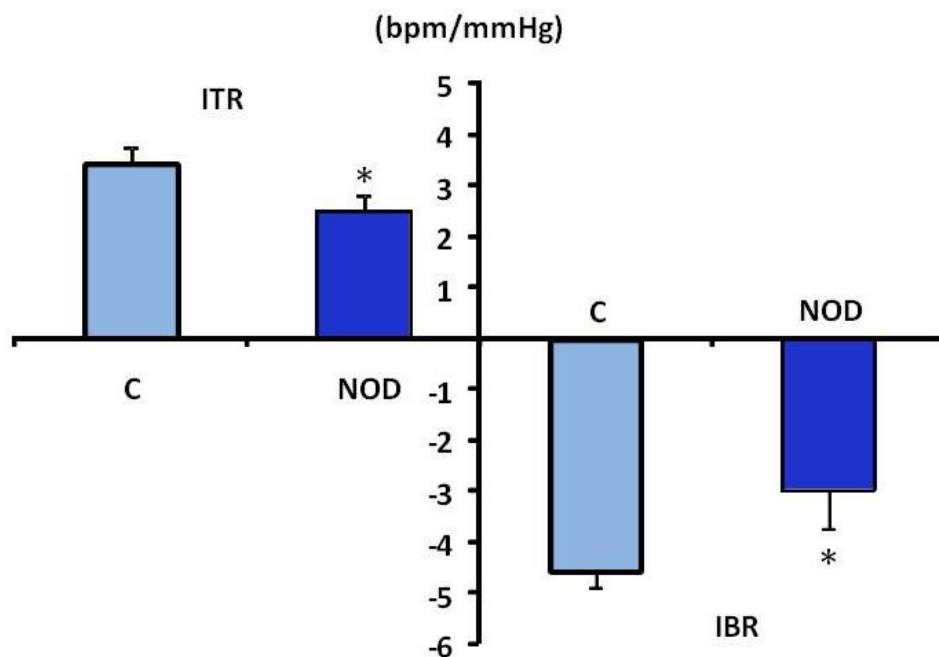


Figura 5. Sensibilidade barorreflexa avaliada pelas respostas taquicárdicas e bradicárdicas grupos controle e NOD. ITR = Índice de taquicardia reflexa, IBR = Índice de bradicardia reflexa, C = controle. Valores apresentados como média e erro padrão. Teste t de Student; * $p < 0,05$.

5.3 Modulação autonômica cardiovascular

As avaliações da modulação autonômica da frequência cardíaca no domínio do tempo e da frequência são apresentadas na Tabela 2. A variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo mostrou uma menor variância do intervalo de pulso no

grupo NOD quando comparado ao grupo controle (Figura 6). Além disso, o RMSSD, um índice de modulação vagal, foi significativamente menor no grupo NOD quando comparado ao grupo controle (Figura 7).

Na análise no domínio da frequência o componente normalizado de baixa frequência do intervalo de pulso, que representa a modulação simpática para o coração, foi significativamente maior nos camundongos NOD quando comparado aos camundongos controles (Figura 8). Além disso, o componente normalizado de alta frequência, que representa a modulação parassimpática para o coração foi significativamente menor no grupo NOD em relação ao controle (Figura 9). Conseqüentemente, o balanço simpatovagal foi maior no grupo NOD quando comparado ao grupo controle (Figura 10).

Tabela 2. Variabilidade da frequência cardíaca nos grupos controle e NOD

Variáveis	Controle (n=6)	NOD (n=6)
VAR IP (ms ²)	42,02 ± 6,54	21,07 ± 3,75 *
RMSSD (ms)	8,28 ± 0,97	4,01 ± 0,32 †
BF IP (ms ²)	5,57 ± 0,7 ms	8,28 ± 2,0 *
AF IP (ms ²)	26,0 ± 6,0	5,29 ± 5,0 †
BF IP nu(%)	20,0 ± 4,0	61,0 ± 4,0†
AF IP nu(%)	80,0 ± 4,0	39,0 ± 4,0†
BF/AF	0,27 ± 0,06	1,5 ± 0,24†

Valores apresentados como média e erro padrão. VAR IP = variância do intervalo de pulso, RMSSD = raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre intervalos RR consecutivos, BF IP = componente de baixa frequência do intervalo de pulso, AF IP = componente de alta frequência do intervalo de pulso, BF IP nu = componente normalizado de baixa frequência do intervalo de pulso, AF IP nu = componente normalizado de alta frequência do intervalo de pulso, BF/AF = balanço simpatovagal. Teste t de Student; * p < 0,05; † p < 0,01.

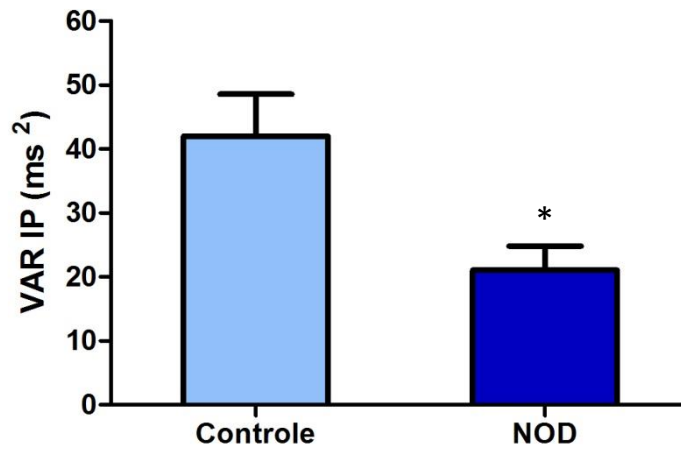


Figura 6. Variância do intervalo de pulso dos grupos controle e NOD. VAR IP = Variância do intervalo de pulso. Valores apresentados como média e erro padrão. Teste t de Student; *p < 0,05.

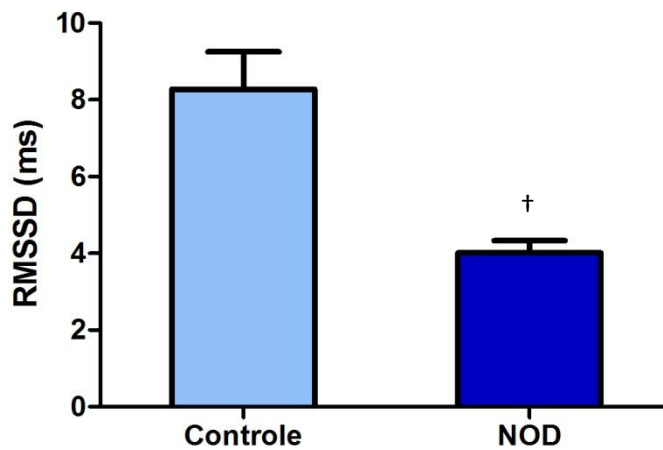


Figura 7. RMSSD dos grupos controle e NOD. RMSSD = raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre intervalos RR consecutivos. Valores apresentados como média e erro padrão. Teste t de Student; †p < 0,01.

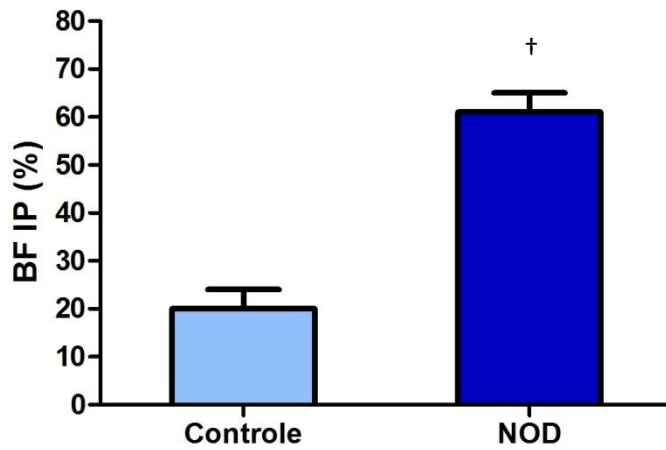


Figura 8. Componente normalizado de baixa frequência do intervalo de pulso dos grupos controle e NOD. BF IP = componente normalizado de baixa frequência do intervalo de pulso. Valores apresentados como média e erro padrão. Teste t de Student; † $p < 0,01$.

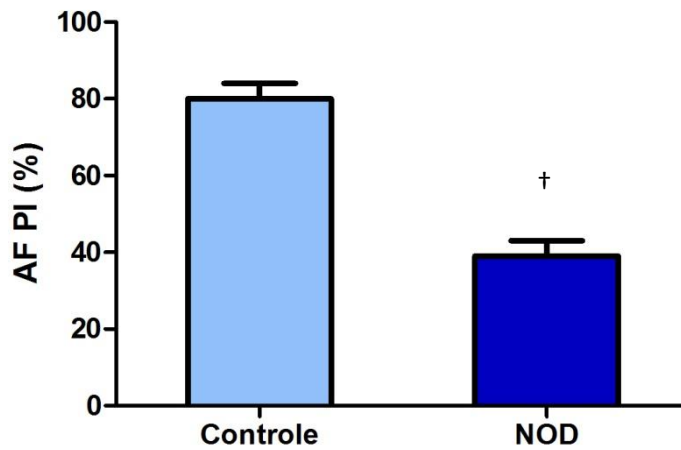


Figura 9. Componente normalizado de alta frequência do intervalo de pulso dos grupos controle e NOD. AF IP = componente normalizado de alta frequência do intervalo de pulso. Valores apresentados como média e erro padrão. Teste t de Student; † $p < 0,01$.

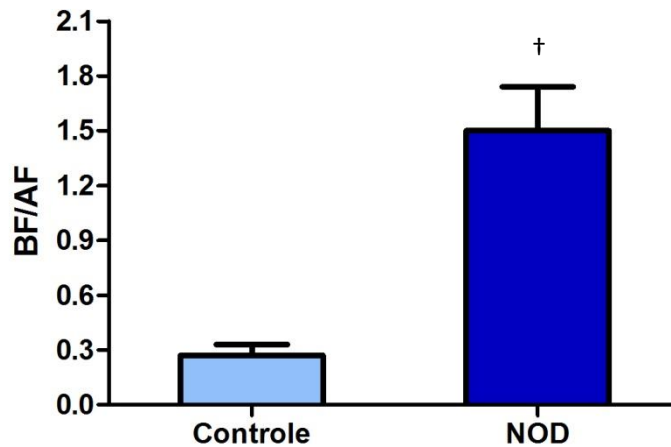


Figura 10. Balanço simpatovagal dos grupos controle e NOD. AF = componente de alta frequência do intervalo de pulso, BF = componente de baixa frequência do intervalo de pulso. Valores apresentados como média e erro padrão. Teste t de Student; † $p < 0,01$.

Em relação à variabilidade da pressão arterial, a variabilidade da pressão arterial sistólica não apresentou diferença significativa entre os grupos NOD e controle, bem como não houve diferença no componente de baixa frequência da pressão arterial sistólica, que representa a modulação simpática para os vasos, entre os grupos NOD e controle (Tabela 3).

Tabela 3. Variabilidade da pressão arterial nos grupos controle e NOD

Variáveis	Controle (n=6)	NOD (n=6)
VAR PAS (mmHg ²)	20,31 ± 3,16	18,60 ± 0,71
BF PAS (mmHg ²)	3,29 ± 0,87	3,13 ± 0,56

Valores apresentados como média e erro padrão. VAR PAS = variância da pressão arterial sistólica, BF PAS = componente de baixa frequência da pressão arterial sistólica. Teste t de Student;

Os resultados da análise simbólica são apresentados na tabela 4. O padrão 0V, indicativo da modulação simpática foi maior no grupo NOD do que no grupo controle, enquanto a modulação parassimpática, demonstrada pelo padrão 2LV foi menor no grupo NOD quando comparado com o grupo controle.

Tabela 4. Análise simbólica da variabilidade da frequência cardíaca dos grupos controle e NOD

Variáveis	Controle (n=6)	NOD (n=6)
padrão 0V	6,06 ± 0,9	11,90 ± 1,4†
padrão 1V	34,52 ± 3,9	40,39 ± 3,18
padrão 2LV	21,20 ± 3,36	7,98 ± 1, 3†
padrão 2UV	38,33 ± 1,70	39,63 ± 4,48

Valores apresentados como media e erro padrão obtidos pela análise simbólica da variabilidade da frequência cardíaca no grupo controle e NOD. 0V = três símbolos iguais (indicam a modulação simpática), 1V = dois símbolos iguais e um diferente (indicam modulação simpática e parassimpática), 2LV = duas variações iguais (indicam modulação parassimpática), 2UV = duas variações diferentes (indicam modulação parassimpática). Teste T de Student ; †p< 0,01.

5.4 Correlações

A análise de correlação foi realizada para verificar associação entre parâmetros autonômicos cardiovasculares e níveis de glicose. Correlações negativas foram encontradas entre índices indicativos de modulação vagal (componente normalizado de alta frequência, RMSSD e 2LV) e os níveis de glicemia ($r = -0,88$; $r = -0,87$ e $-0,89$; respectivamente, $p < 0,01$) Além disso, o balanço simpatovagal apresentou correlação positiva com os níveis de glicemia ($r = - 0,88$; $p < 0,01$).

6. DISCUSSÃO

Na busca de uma melhor compreensão das alterações autonômicas que ocorrem no DM1, o objetivo do presente estudo foi avaliar a função autonômica cardiovascular de camundongos NOD. O principal achado do presente estudo foi que camundongos NOD apresentam disfunção autonômica cardiovascular demonstrada pelo prejuízo na sensibilidade barorreflexa e mudanças na modulação autonômica cardiovascular

Em contraste com dados de um estudo anterior (GROSS et al., 2008), nós observamos alterações tanto na modulação simpática quanto na parassimpática e também prejuízo da sensibilidade barorreflexa. Gross e colaboradores (2008) avaliaram a modulação autonômica cardiovascular em camundongos NOD utilizando telemetria e avaliaram a sensibilidade barorreflexa espontânea pelo índice alfa. Os autores sugeriram que o camundongo NOD não representava um modelo experimental e clínico de disfunção autonômica diabética. No entanto, deve ser ressaltado que no estudo de Gross et al. (2008), as avaliações autonômicas foram realizadas antes do desenvolvimento do diabetes e após a quarta semana do surgimento da doença, diferentemente do nosso estudo que considerou uma fase mais avançada do diabetes. Nesse sentido, Fazan e colaboradores (1999) avaliaram a modulação autonômica cardíaca em diferentes estágios de diabetes induzido por estreptozotocina (STZ) e observaram declínios mais acentuados na VFC em estágios mais avançados de diabetes. Dessa forma, em uma fase mais precoce da progressão do diabetes a disfunção autonômica pode ainda não ser evidenciada, como demonstrado por Schaan et al. (1997) em ratos diabéticos por STZ.

Além disso, o método utilizado para avaliação da sensibilidade barorreflexa também diferiu entre os estudos. Enquanto nós avaliamos as respostas reflexas à infusão de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, Gross e colaboradores (2008) avaliaram a sensibilidade barorreflexa por meio do método da sequencia e pela análise espectral. Alguns autores consideram que os índices espontâneos são inconsistentes com a função barorreflexa. Para Lipman e colaboradores (2003) os índices espontâneos não estariam correlacionados com os resultados da sensibilidade barorreflexa obtidos com administração de drogas vasoativas e com a distensibilidade das carótidas em humanos. Moffitt e colaboradores também acreditam que os métodos espontâneos não são confiáveis quando comparados aos métodos tradicionais utilizando administração de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Nesse sentido Rodrigues et al. (2011)

demonstraram que o valor do ganho do barorreflexo calculado pela técnica da sequencia foi diferente do obtido por meio da infusão de fenilefrina em camundongos.

Outro fator importante a ser considerado, que pode ter influenciado para que os nossos dados fossem diferentes dos obtidos por Gross e colaboradores (2008), diz respeito aos animais utilizados como controle. No estudo de Gross et al (2008) foram utilizados os camundongos NOD que não desenvolveram diabetes como controles, enquanto que nós utilizamos camundongos suíços. Leiter, um dos pioneiros na utilização do camundongo NOD como modelo experimental de diabetes tipo I, em seu estudo (LEITER, 1993) apresenta os modelos que seriam adequados para servirem como controle nos estudos com esses animais, sendo que o autor indica a utilização do camundongo suíço como controle para a linhagem do camundongo NOD que foi utilizada nos estudos.

Em nossos dados observamos uma redução da VFC, avaliada tanto pela variância total quanto pela média dos desvios padrões do intervalo de pulso. Tanto os estudos que utilizaram os modelos animais (FAZAN et al., 1997; FAZAN et al., 1999) quanto os estudos em seres humanos (GOTTSÄTER et al., 2006) assumem em consenso que esta redução na VFC pode estar associada á duração do diabetes como também à gravidade da mesma.

Em 2001 Porta et al. apresentaram uma nova ferramenta para avaliação da VFC baseada na análise simbólica. De acordo com Porta et al. (2007), a análise espectral da VFC é baseada em definição de bandas de frequências cujos limites são estabelecidos por convenção; além disso, esse tipo de análise detectaria mudanças recíprocas nas modulações simpática e parassimpática. Já a análise simbólica seria capaz de evitar modificações não recíprocas ou alterações recíprocas com diferentes magnitudes visto que a soma de todos os parâmetros na análise simbólica é igual a 100%.

De acordo com Malliani et al (1991), a análise simbólica é um método mais sensível do que a análise espectral. Em condições caracterizadas por uma variabilidade muito baixa a análise espectral perderia a sua confiabilidade.

Dessa forma, a análise simbólica se tornou uma poderosa ferramenta já validada para detectar mudanças na modulação autonômica da variabilidade cardiovascular. Estudos com testes autonômicos e bloqueio farmacológico mostraram que o padrão 0V da análise simbólica está relacionado com a modulação simpática cardíaca, o padrão 1V representaria ambas as modulações, simpática e parassimpática, e os padrões 2LV e

2UV estão relacionados com a modulação parassimpática cardíaca (GUZZETTI et al., 2005; PORTA et al., 2007).

Quanto à análise simbólica verificamos que o padrão 0V, indicativo da modulação simpática foi maior no grupo NOD do que no grupo controle, enquanto o padrão 2LV, indicativo da modulação parassimpática, foi menor no grupo NOD quando comparado com o grupo controle. Esses dados reforçam os resultados obtidos pela análise espectral onde observamos aumento do componente de baixa frequência e redução do componente de alta frequência nos camundongos NOD.

O estudo de Colucci et al. (2011) demonstrou que camundongos NOD apresentam aumento na razão ECA/ECA2 no rim e aumento da atividade da ECA na glândula supra-renal, o que poderia contribuir para o aumento da modulação simpática nesses animais. A importância desses achados se baseia na ideia de que o aumento na atividade simpática, bem como a redução da modulação vagal podem estar associados a aumento de eventos ectópicos e da mortalidade Billman (2009).

Os mecanismos de mudanças na variabilidade da FC em pacientes diabéticos podem estar relacionados à neuropatia autonômica e, conseqüentemente, à lesão nos nervos parassimpáticos e/ou simpáticos. Dessa forma, o estudo da variabilidade da FC é uma poderosa ferramenta para inferir sobre, por exemplo, a integridade funcional do sistema parassimpático cardíaco. De fato, Fazan e cols. (1999), demonstraram que uma redução da variabilidade da FC estava associada à diminuição dos componentes de baixa frequência (LF), indicador de modulação simpática, e alta frequência (HF), indicador de modulação parassimpática.

A neuropatia autonômica é uma complicação frequente do diabetes mellitus e está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade em pacientes sintomáticos (EWING; CAMPBELL; CLARKE; 1980). Em indivíduos diabéticos, a VFC pode preceder sintomas clínicos de disfunção autonômica (MALIK et al., 1996). Estas alterações observadas nos animais NOD foram similares às observadas em estudos do nosso laboratório em animais diabéticos induzidos por STZ (MAEDA et al., 1995, DALL'AGO et al., 2002; DE ANGELIS et al., 2012; RODRIGUES, B. et al., 2013).

Maeda et al. (1995) demonstraram uma redução do tônus vagal, a manutenção do tônus simpático para o coração e diminuição da pressão arterial e da frequência cardíaca. As mesmas alterações foram demonstradas por Wegner et al. (1987), sugerindo a presença de neuropatia vagal.

Nesse sentido, alguns estudos têm demonstrado que camundongos NOD parecem ser um modelo válido de neuropatia autonômica, que corresponde as características patológicas de outros modelos de roedores e humanos (SCHMIDT et al., 2003).

O controle barorreflexo da circulação é um dos mais importantes mecanismos de controle momento a momento da pressão arterial. Indivíduos com diabetes que apresentam reflexos cardiovasculares normais possuem uma menor mortalidade do que aqueles com algum prejuízo na função reflexa autonômica (EWING; CAMPBELL; CLARKE; 1980).

Um método tradicional utilizado para avaliar o barorreflexo é a utilização de drogas vasoativas para ocasionar alterações na pressão arterial e então mensurar as alterações reflexas na frequência cardíaca. Essa técnica fornece um índice de como as alterações na frequência cardíaca podem compensar as alterações na pressão arterial (KUMADA; TERUI; KUWAKI, 1990; VASQUES et al.; 1997).

Em nosso estudo observamos diminuição da bradicardia reflexa em resposta à infusão de fenilefrina, bem como diminuição da taquicardia reflexa em resposta a infusão de nitroprussiato de sódio. De forma semelhante Rodrigues e colaboradores (2013), observaram redução de ambas as respostas, bradicárdica e taquicárdica, em animais diabéticos por STZ. De acordo com Page e Watkins (1978) e Maeda et al. (1995), o prejuízo da resposta taquicárdica mediada pelo barorreflexo ocorre em uma fase precoce do desenvolvimento do diabetes induzido por STZ. Numa fase mais tardia (15 e 30 dias após administração de STZ), observa-se também redução da resposta bradicárdica nesse modelo (DALL'AGO et al., 1997; HARTHMAN et al., 2007).

O prejuízo da sensibilidade barorreflexa tem sido associado com alteração do componente parassimpático da via do barorreflexo (WESTON et al., 1998) e também com a duração do diabetes em pacientes com DM1 (DALLA POZZA et al., 2007).

Em estudo realizado por Dall'Ago e colaboradores (2002), observou-se que o principal responsável pela alteração da sensibilidade barorreflexa observada no diabetes por STZ em curto prazo não é o ramo eferente do reflexo comandado pelos pressoreceptores, mas sim que o sistema nervoso central deve ser o sítio responsável pela alteração no barorreflexo, uma vez que os autores não observaram alterações funcionais da eferência desses barorreceptores em ratos diabéticos por STZ, quando a

resposta do vago foi testada por estimulação direta e se apresentou até maior do que nos animais controle.

Em camundongos NOD a deficiência de insulina poderia contribuir para diminuição da sensibilidade barorreflexa, já que em estudo realizado por Chang e Lund (1986) a suplementação com insulina melhorou a sensibilidade barorreflexa em outro modelo de diabetes experimental.

Nesse estudo, embora tenhamos observado diminuição da sensibilidade barorreflexa em camundongos NOD, não houve diminuição da pressão arterial ou da FC, o que poderia sugerir uma menor disfunção autonômica nesse modelo, quando comparados com o modelo de indução por STZ. No entanto, mais estudos são necessários para testar essa hipótese.

De forma semelhante aos resultados do nosso estudo, Hong et al. (2012), mostraram que ratos Sprague-Dawley pré-diabéticos devido a administração de STZ e nicotinamida apresentaram uma significativa alteração na resposta bradicárdica mesmo sem mudanças na frequência cardíaca e na pressão arterial. Com a progressão da hiperglicemia (12 semanas), ambas as respostas estavam alteradas. Esta alteração parece estar associada com a duração e a severidade da hiperglicemia. Além disso, segundo os autores, no estado pré-diabético as alterações do barorreflexo podem ocorrer antes das mudanças na frequência cardíaca e na pressão arterial.

De acordo com Pagani e colaboradores (1988), pacientes com diabetes mellitus que apresentam neuropatia autonômica possuem uma redução na capacidade de regular a frequência cardíaca, o que se deve não só a diminuição da sensibilidade barorreflexa como também a uma disfunção parassimpática cardíaca e/ou central. As alterações causadas pelo diabetes ao sistema nervoso parassimpático podem reduzir a VFC, tornando-se assim um importante índice de disautonomia nestes pacientes (PAGANI et al., 1988).

Levando em consideração que a função autonômica é um importante marcador de morbidade e mortalidade cardiovascular (LA ROVERE et al., 1998; MASER et al., 2003; VINIK; ZIEGLER, 2007), a função autonômica cardiovascular nesse modelo deveria ser investigada ao longo do tempo e em diferentes fases do diabetes.

Além disso, as alterações autonômicas observadas no presente estudo foram correlacionadas com níveis glicêmicos. Similarmente, Mostarda et al. (2009) mostraram que a redução da variabilidade da frequência cardíaca e da modulação vagal, tanto no

domínio do tempo quanto da frequência, podem estar associadas com níveis glicêmicos em ratos diabéticos por STZ.

Esta relação também foi observada em humanos. Em um estudo prospectivo foi observado que indivíduos portadores de DM1 com neuropatia autonômica cardíaca apresentavam um baixo controle glicêmico (ABD EL DAYEM et al., 2011).

Os níveis glicêmicos per se parecem ser um proeminente fator associado à disfunção autonômica diabética. Wu et al. (2007), demonstraram que alteração na função autonômica cardíaca estava associada com redução da tolerância a glicose, ainda Stein et al. (2007), observaram associação entre disfunção autonômica e glicemia de jejum alterada em indivíduos não diabéticos.

Vários mecanismos metabólicos têm sido propostos para explicar a relação existente entre a duração e severidade da hiperglicemia e o desenvolvimento de neuropatia diabética. A ativação da via dos polióis pela glicose, que promove acumulação de sobitol e frutose e diminuição da velocidade de condução nervosa por alteração da atividade neural da Na⁺ K⁺ ATPase ou por perturbação dos mecanismos osmorregulatórios fisiológicos normais tem sido um dos mecanismos mais estudados. Podemos citar ainda outros fatores que parecem estar associados com o desenvolvimento da neuropatia diabética, entre eles, o metabolismo anormal de lipídios ou aminoácidos, a formação de radicais superóxido e a glicação de proteínas. Essas alterações metabólicas no nervo são acompanhadas por hipóxia e insuficiência vascular o que pode contribuir para o dano nas fibras nervosas (GREENE et al., 1992).

Além disso, Vinik e Ziegler (2007) relataram que a idade, o baixo controle glicêmico e o tempo de duração do diabetes tem um papel fundamental no desenvolvimento e na progressão da neuropatia autonômica cardiovascular. Contudo, embora exista esta relação entre controle glicêmico e neuropatia autonômica, ainda não está bem estabelecido qual precederia o outro e portanto, se um deles poderia ser um gatilho para o outro e as demais complicações associadas a essas alterações.

Perspectivas

Tem sido sugerido que a avaliação regular da variabilidade da frequência cardíaca proporciona a detecção precoce da NAC que, posteriormente, pode levar a intervenção terapêuticas oportunas. Por exemplo, é sugerido que a neuropatia periférica

pode ser atenuada se a detecção oportuna e intervenção terapêuticas apropriadas são administradas (SRINIVASAN; STEVENS; WILEY, 2000). Detecção precoce significa que, eventualmente, o tratamento em pacientes pré-diabéticos ou em condições pré-diabéticas possam reduzir o comprometimento do sistema nervoso periférico no curso dessa doença (EWING; CAMPBELL; CLARKE; 1980).

Nesse sentido, intervenções que possam modificar funcionalmente o sistema nervoso autônomo poderiam ser utilizadas para modificar o curso natural do DM1. Entre elas o treinamento físico regular, já amplamente recomendado em pacientes com diabetes, nunca foi estudado como elemento interventor no curso do DM1 dos animais NOD. Essa seria uma nova perspectiva de trabalho, dando continuidade ao estudo da fisiopatologia do DM1 em camundongos NOD.

7. CONCLUSÃO

Baseado nos métodos utilizados nesse estudo e levando em consideração a idade e a fase do diabetes, verificamos que os camundongos NOD apresentam comprometimento da função autonômica, evidenciada por: diminuição da sensibilidade barorreflexa (comprometimento tanto da resposta taquicárdica quanto da bradicárdica), diminuição da variabilidade da frequência cardíaca, aumento da modulação simpática e redução da modulação parassimpática para o coração.

Além disso, essa disautonomia cardiovascular pode estar relacionada aos níveis glicêmicos dos camundongos NOD, já que verificamos uma correlação negativa entre índices de modulação vagal e glicemia, bem como correlação positiva entre balanço simpatovagal e glicemia.

8. REFERÊNCIAS

ABD EL DAYEM, S. M.; BATTAH, A. A.; SOLIMAN, R. Natural progression of cardiac autonomic neuropathy in patients with type 1 diabetes: a four-year follow-up study. **Anadolu Kardiyol Derg**, v. 11, p. 224-31, 2011.

ACHARJEE, S. et al. Understanding Type 1 Diabetes: Etiology and Models. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 37, n. 4, p. 269-276, 2013.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P. Z. New diagnostic criteria and classification of diabetes--again? **Diabet Med**, v. 15, n. 7, p. 535-6, 1998.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, **Diabetes Care**, v. 32, Suppl 1, p. S62–S67, 2009.

AMERICAN DIEBETS ASSOCIATION. Defining and reporting hypoglycemia in diabetes: a report from the American Diabetes Association Workgroup on Hypoglycemia. **Diabetes Care**, v. 28, n. 5, p. 1245-9, 2005.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 26, Suppl 1, p. S5-20, 2003.

ATKINSON, M. A.; LEITER, E. H. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? **Nat Med**, v. 5, n. 6, p. 601-4, 1999.

BILLMAN, G. E. Cardiac autonomic neural remodeling and susceptibility to sudden cardiac death: effect of endurance exercise training. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 297, p.1171-1193, 2009.

BOTTAZZO, G. F.; FLORIN-CHRISTENSEN, A.; DONIACH, D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. **Lancet**, v. 2, p. 1279-83, 1974.

BUSCHARD, K. What causes type 1 diabetes? Lessons from animal models. **APMIS**, v. 119, p. 1-19, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National Diabetes Fact Sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States, 2011. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2011.

COLUCCI, J. A. et al. Renin-angiotensin system may trigger kidney damage in NOD mice. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 12, n. 1, p. 15-22, Mar 2011.

DABELEA, D. et al. Incidence of diabetes in youth in the United States. **JAMA**, v. 297, n. 24, p. 2716-24, Jun 27 2007.

DALL'AGO, P. et al. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, n. 1, p.119-24, 1997.

DALL'AGO, P. et al. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 843-849, 2002.

DALLA POZZA, R. et al. Impaired short-term blood pressure regulation and autonomic dysbalance in children with type 1 diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 50, n. 12, p. 2417-23, Dec 2007.

DA PUREZA, D. Y. et al. Acute exercise adjustments of cardiovascular autonomic control in diabetic rats. **Muscle Nerve**, v. 46, n. 1, p. 96-101, Jul 2012.

DAVIES, C. T.; NEILSON, J. M. Sinus arrhythmia in man at rest. **Journal of Applied Physiology**, v. 22, n. 5, p. 947-55, May 1, 1967.

DOI, T. et al. Glomerular lesions in nonobese diabetic mouse: before and after the onset of hyperglycemia. **Lab Invest**, v. 63, n. 2, p. 204-12, Aug 1990.

DE ANGELIS, K. L. et al. Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 6, p. 635-41, Jun 2000.

_____. Cardiovascular control in experimental diabetes. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 9, p. 1091-100, 2002.

_____. et al. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. **J Appl Physiol**, v. 96, n. 6, p. 2174-2178, 2004.

_____. et al. Disfunção autonômica cardiovascular no diabetes mellitus experimental. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, p. 185-194, 2007.

DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. C.; MORRIS, M. Diabetes and cardiovascular autonomic dysfunction: application of animal models. **Auton Neurosci**, v. 145, n. 1-2, p. 3-10, 2009.

DEVENDRA, D.; LIU, E.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: recent developments. **BMJ**, v. 328, n. 7442, p. 750-4, 2004.

EISENBARTH, G. S. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. **N Engl J Med**, v. 314, n. 21, p. 1360-8, 1986.

EWING, D. et al. The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. **Diabetes Care**, v. 8, p. 491-8, 1985.

EWING, D. J.; CAMPBELL, I.W.; CLARKE, B.F.; The natural history of diabetic autonomic neuropathy. **Q J Med**, v. 49, n. 19, p. 95-108, 1980.

FARAH, V. et al. Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. **Auton Neurosci**, v. 130, n. 1-2, p. 41-50, 2006.

FAZAN, R. JR. et al. Heart rate variability and baroreceptor function in chronic diabetic rats. **Hypertension**, v. 30, n. 3 Pt 2, p. 632-5, 1997.

_____. et al. Power spectra of arterial pressure and heart rate in streptozotocin induced diabetes in rats. **J Hypertens**, v. 17, p. 489-95, 1999.

FLECKNELL, P.A. The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the relief of pain in laboratory rodents and rabbits. **Lab Anim**, v. 26, p. 241-255, 1992.

FOULIS, A. K. et al. The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. **Diabetologia**, v. 29, n. 5, p. 267-74, 1986.

GALINIER, M. et al. Depressed low frequency power of heart rate variability as an independent predictor of sudden death in chronic heart failure. **Eur Heart J**, v. 21, n. 6, p. 475-82, 2000.

GREENE, D. A. et al. Complications: Neuropathy, Pathogenetic Considerations. **Diabetes Care**, v. 15, n. 12, p. 1902-1925, 1992.

GROSS, D. J. et al. The immunomodulator Linomide: role in treatment and prevention of autoimmune diabetes mellitus. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 6, p. 1131-1139, 2001.

GROSS, V. et al. Cardiovascular autonomic regulation in Non-Obese Diabetic (NOD) mice. **Auton Neurosci**, v. 138, n. 1-2, p. 108-13, 2008.

GOTTSÄTER, A. et al. Decreased heart rate variability may predict the progression of carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. **Clinical Autonomic Research**, v. 16, n. 3, p. 228-234, 2006.

GROUP, S. F. D. I. Y. S. The Burden of Diabetes Mellitus Among US Youth: Prevalence Estimates From the SEARCH for Diabetes in Youth Study. **Pediatrics**, v. 118, n. 4, p. 1510-1518, 2006.

GUZZETTI, S. et al. Symbolic dynamics of heart rate variability: a probe to investigate cardiac autonomic modulation. **Circulation**, v. 112, n. 4, p. 465-70, 2005.

HARTHMANN, A. D. et al. Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats. **Auton Neurosci**, v. 133, n. 2, p. 115-20, 2007.

HEEREN, M. V. et al. Exercise improves cardiovascular control in a model of dislipidemia and menopause. **Maturitas**, v. 62, n. 2, p. 200-4, 2009.

HONG, L. Z. et al. Modulation of baroreflex function by rosiglitazone in prediabetic hyperglycemic rats. **Physiol Res**, v. 61, n. 443-452, 2012.

JORGE, L. et al. Cardiac and peripheral adjustments induced by early exercise training intervention were associated with autonomic improvement in infarcted rats: role in functional capacity and mortality. **Eur Heart J**, v. 32, p. 904-912, 2012.

KARVONEN, M. et al. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. **Diabetes Care**, v. 23, n. 10, p. 1516-26, 2000.

KIKUTANI, H.; MAKINO, S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. **Adv Immunol**, v. 51, p. 285-322, 1992.

KODAMA, S. et al. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. **Science**, v. 302, n. 5648, p. 1223-7, 2003.

KUMADA, M.; TERUI, N.; KUWAKI, T. Arterial baroreceptor reflex: its central and peripheral neural mechanisms. **Prog Neurobiol**, v. 35, n. 5, p. 331-61, 1990.

LA ROVERE, M. T, et al. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. **Lancet**, v. 351, p. 478–484, 1998.

LEITER, E. H. The role of environmental factors in modulating insulin dependent diabetes. In: VRIES, R. D.; COHEN, I.; ROOD, J. J. Current Topics in Immunology and Microbiology: **The Role of Microorganisms in Noninfectious Disease**, Berlin: Springer Verlag, 1990. p. 39-55.

_____. The NOD Mouse: A Model for Analyzing the Interplay Between Heredity and Environment in Development of Autoimmune Disease. **ILAR Journal**, v. 35, n. 1, p. 4-14, 1993.

_____. The NOD Mouse: A Model for Analyzing the Interplay Between Heredity and Environment in Development of Autoimmune Disease. **ILAR J**. v. 35, 1993.

_____. NOD/LtJ Mice Available. JAX® NOTES, 1993b. Disponível em: <<http://jaxmice.jax.org/jaxnotes/archive/452a.html>>. Acesso em: 10/07/2012.

_____. The NOD mouse: a model for insulin-dependent diabetes mellitus. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 15, p. Unit 15 9, 2001.

LIPMAN, R. D.; SALISBURY, J. K.; TAYLOR, J. A. Spontaneous indices are inconsistent with arterial baroreflex gain. **Hypertension**, v. 42, n. 4, p. 481-7, 2003.

LIU, E.; EISENBARTH, G. S. Type 1A diabetes mellitus-associated autoimmunity. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 31, n. 2, p. 391-410, 2002.

MAEDA, C. Y. et al. Streptozotocin diabetes modifies arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. **Braz J Med Biol**, v. 28, p. 497–501. 1995a.

MAKINO, S. et al. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. **Jikken Dobutsu**, v. 29, n. 1, p. 1-13, 1980.

MAKINO, S. et al. Effect of castration on the appearance of diabetes in NOD mouse. **Jikken Dobutsu**, v. 30, n. 2, p. 137-40, Apr 1981.

MALIK, M. et al. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. **Eur Heart J**, v. 17, n. 3, p. 354–381, 1996.

MALLIANI, A. et al. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**, v. 84, n. 2, p. 482-92, 1991.

MALIK, M. et al. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. **European Heart Journal**, v. 17, n. 3, p. 354-381, 1996.

MARCO, G. S. et al. Diabetes induces changes of catecholamines in primary mesangial cells. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 40, n. 4, p.747-754, 2008.

MASER, R. E. et al. The association between cardiovascular autonomic neuropathy and mortality in individuals with diabetes: a meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 26, p. 1895-1901, 2003.

MOSTARDA, C. et al. Benefits of exercise training in diabetic rats persist after three weeks of detraining. **Auton Neurosci**, v. 28, n.145, p.11-16, 2009.

MAHAFFY, J.; EDELSTEIN-KESHET, L. Modeling Cyclic Waves of Circulating T Cells in Autoimmune Diabetes. **SIAM Journal on Applied Mathematics**, v. 67, n. 4, p. 915-937, 2007.

PAGE, M. M.; WATKINS, P. J. Cardiorespiratory arrest and diabetic autonomic neuropathy. **The Lancet**, v. 311, n. 8054, p. 14-16, 1978.

PAGANI, M. et al. Spectral analysis of heart rate variability in the assessment of autonomic diabetic neuropathy. **J Auton Nerv Syst**, v. 23, n. 2, p. 143-53, 1988.

PAVIN, E. J.; ZOLLNER, R. L. Implantação da linhagem NOD-mice (camundongos diabéticos não-obesos) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino-dependente e outras doenças autoimunes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 38, p. 105-108, 1994.

PIRART, J. Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4400 patients observed between 1947 and 1973. **Diabetes Metab.** v. 3, n. 2, p. 97-102, 1977.

PORTA, A. et al T. Assessment of cardiac autonomic modulation during graded head-up tilt by symbolic analysis of heart rate variability. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 293, n. 1 p. H702-708, 2007.

POZZILLI, P. Prevention of insulin-dependent diabetes mellitus 1998. **Diabetes Metab Rev**, v. 14, n. 1, p. 69-84, 1998.

RODRIGUES, B. et al. Aerobic exercise training delays cardiac dysfunction and improves autonomic control of circulation in diabetic rats undergoing myocardial infarction. **J Card Fail**, v. 18, n. 9, p. 734-44, 2012.

_____. et al. Impact of myocardial infarction on cardiac autonomic function in diabetic rats. **J Diabetes Complications**, v. 27, n. 1, p. 16-22, 2013.

RODRIGUES, F. L. et al. Effect of baroreceptor denervation on the autonomic control of arterial pressure in conscious mice. **Exp Physiol**, v. 96, n. 9, p. 853-62, 2011.

SAWICKI, P.T, et al. The value of QT interval dispersion for identification of total mortality risk in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J Intern Med**; v. 243, p. 49-56, 1998.

SCHAAN, B. D. et al. Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in streptozotocin-induced diabetic rats treated with insulin. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, p. 1081-1086, 1997.

_____. et al. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1895-1902, 2004.

SCHROEDER, E. B. et al. Diabetes, glucose, insulin, and heart rate variability: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. **Diabetes Care**, v. 28, n. 3, p. 668-74, 2005.

SCHMIDT, R. E. et al. Non-obese diabetic mice rapidly develop dramatic sympathetic neuritic dystrophy: a new experimental model of diabetic autonomic neuropathy. **Am J Pathol**, v. 163, n. 5, p. 2077-91, 2003.

SCHUMER, M. P.; JOYNER, S. A.; PFEIFER, M. A. Cardiovascular autonomic neuropathy testing in patients with diabetes. **Diabetes Spectrum**, v. 11, p. 227–231, 1998.

SHIZURU, J. A. et al. Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. **Science**, v. 240, n. 4852, p. 659-62, 1988.

SILVA, K. A. et al. Previous exercise training has a beneficial effect on renal and cardiovascular function in a model of diabetes. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48826, 2012.

SOARES, P.P. et al. Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. **Auton Neurosci**, v. 113, p. 24–31, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009 [3.ed.]. - Itapevi: Silva Farmacêutica, 2009.

SRINIVASAN, S.; STEVENS, M.; WILEY, J. W. Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction. **Diabetes**, v. 49, n. 11, p. 1932-8, 2000.

STEIN, P. K. et al. The relationship of heart rate and heart rate variability to non-diabetic fasting glucose levels and the metabolic syndrome: the Cardiovascular Health Study. **Diabet Med**, v. 24, n. 8, p. 855-63, 2007.

TOMLINSON, K. C. et al. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. **Pharmacological Reviews**, v. 44 p. 103-148, 1981.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). **Lancet**, v. 352, p. 854–65, 1998.

VANDEWALLE, C. L. et al. Epidemiology, clinical aspects, and biology of IDDM patients under age 40 years. Comparison of data from Antwerp with complete ascertainment with data from Belgium with 40% ascertainment. The Belgian Diabetes Registry. **Diabetes Care**, v. 20, n. 10, p. 1556-61, 1997.

VAN DER VLIET, H. J. J. et al. Circulating V α 24+ V β 11+ NKT Cell Numbers Are Decreased in a Wide Variety of Diseases That Are Characterized by Autoreactive Tissue Damage. **Clinical Immunology**, v. 100, n. 2, p. 144-148, 2001.

VASQUES, E.C. et al. Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 521-532, 1997.

VINIK, A. I.; Ziegler, D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. **Circulation**, v. 115, p. 387-397, 2007.

VIRAG, L. et al. Requirement of intracellular calcium mobilization for peroxynitrite-induced poly(ADP-ribose) synthetase activation and cytotoxicity. **Mol Pharmacol**, v. 56, n. 4, p. 824-33, 1999.

WEGNER, J. A. et al. Select cardiovascular and metabolic responses of diabetic rats to moderate exercise training. **Med Sci Sports Exerc**, v. 19, p. 497-503, 1987.

WESTON, P. J. et al. Evidence of defective cardiovascular regulation in insulin-dependent diabetic patients without clinical autonomic dysfunction. **Diabetes research and clinical practice**, v. 42, n. 3, p. 141-148, 1998.

WICHI, R. et al. Noninvasive and invasive evaluation of cardiac dysfunction in experimental diabetes in rodents. **Cardiovasc Diabetol**. v. 6, p. 14, 2007.

WONG, F. S.; JANEWAY, C. A. Jr. The role of CD4 and CD8 T cells in type I diabetes in the NOD mouse. **Res Immunol**, v. 148, n. 5, p. 327-32, 1997.

WU, J. S. et al. Epidemiological Evidence of Altered Cardiac Autonomic Function in Subjects with Impaired Glucose Tolerance But Not Isolated Impaired Fasting Glucose. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 10, p. 3885-3889, 2007.

ZAMO, F. S. et al. The renin–angiotensin system is modulated by swimming training depending on the age of spontaneously hypertensive rats. **Life Sci**, v. 18, n. 89, p. 93-99, 2011.

YANG, B.; CHON, K. H. Assessment of diabetic cardiac autonomic neuropathy in type I diabetic mice. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc**, v. 2011, p. 6560-3, 2011.

ZIEGLER, D. et al. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy multicenter study group: the epidemiology of diabetic neuropathy. **J Diabetes Complications**, v. 6, p. 49-57, 1992.

ANEXOS

ANEXO A. ARTIGO PUBLICADO



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical

journal homepage: www.elsevier.com/locate/autneu

Cardiovascular autonomic dysfunction in non-obese diabetic mice

Oscar A. Moraes^{a,b,1}, Juliana A. Colucci^{c,1}, Leandro E. Souza^a, Kátia B. Scapini^a, Ivana C. Moraes-Silva^a, Cristiano Mostarda^{a,d}, Kátia De Angelis^b, Dulce E. Casarini^c, Maria Cláudia Irigoyen^{a,b,*}^a Hypertension Unit, Heart Institute (InCor), School of Medicine, University of São Paulo (FMUSP), 44 Dr Eneas de Carvalho Aguiar Avenue, 05403-000 São Paulo/SP, Brazil^b Nove de Julho University, São Paulo/SP, Brazil^c Nephrology Division, Department of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo/SP, Brazil^d Hospital Materno-Infantil, Federal University of Maranhão, São Luis/MA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2013

Received in revised form 18 March 2013

Accepted 27 March 2013

Available online xxxx

Keywords:

Diabetes mellitus
Autonomic nervous system
Baroreflex
Mice
Inbred NOD

ABSTRACT

It is known that diabetes is associated with autonomic dysfunction; however, data about autonomic function in non-obese diabetic mice (NOD) remain scarce. We evaluated the autonomic profile of NOD mice. Female mice, 24–28 week old, were divided in two groups: NOD (n = 6) and control (n = 6, Swiss mice). NOD mice with glycemia ≥ 300 mg/dl were used. Heart rate variability (HRV) and arterial pressure variability (APV) in time and frequency domains, symbolic analysis of heart rate (HR) and baroreflex sensitivity were evaluated. HR and arterial pressure (AP) were similar between the groups; however, HRV (total variance of RR interval: NOD = 21.07 ± 3.75 vs. C = 42.02 ± 6.54 ms²) and the vagal modulation index RMSSD were lower in NOD group (4.01 ± 0.32 vs. 8.28 ± 0.97 ms). Moreover, the absolute and normalized low-frequency (LF) components were also enhanced in NOD (normalized = $61.0 \pm 4.0\%$) as compared to control mice (normalized = $20.0 \pm 4.0\%$). Both the absolute and normalized high-frequency (HF) components were lower in NOD (normalized = $39.0 \pm 4.0\%$) when compared to the control group (normalized = $80.0 \pm 4.0\%$). In the symbolic analysis the OV pattern, an indication of sympathetic activity, was higher in NOD and 2LV pattern, an indication of parasympathetic activity, was lower in the NOD than in the control group. Both bradycardic and tachycardic responses were decreased in NOD (3.01 ± 0.72 vs. 4.54 ± 0.36 bpm/mm Hg and 2.49 ± 0.31 vs. C = 3.43 ± 0.33 bpm/mm Hg) when compared to the control group. Correlation analysis showed negative correlations between vagal indexes (RMSSD, %HF and 2LV) and glycemic levels. In conclusion, NOD mice develop severe diabetes correlated with autonomic dysfunction.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

The prevalence of diabetes in modern society has been increasing at epidemic rates, largely related to the prevalence of obesity and sedentary lifestyles. Diabetes increases cardiovascular morbidity and mortality related to autonomic dysfunction, nephropathy and neuropathy (Zimmet et al., 1997).

Among these complications, autonomic neuropathy is a common alteration presented in diabetes mellitus which results in autonomic nerve fiber dystrophy in axons and dendrite abnormalities (Schmidt, 2002). In addition, cardiovascular autonomic neuropathy seems to

be related to increased mortality in diabetic patients (Vinik and Ziegler, 2007). Moreover, both the parasympathetic and sympathetic neurons can be affected by diabetic neuropathy resulting in alterations of heart rate control and vascular dynamics (Schumer et al., 1998). Our group has showed several autonomic, hemodynamic and functional cardiac alterations promoted by experimental diabetes, resulting in higher mortality (Wichi et al., 2007; Mostarda et al., 2009; Jorge et al., 2012). Additionally, it is widely acknowledged that neuropathy promotes a decrease in heart rate variability (HRV) both in time and frequency domains, as demonstrated by alterations in low frequency and high frequency components. On the other hand, it is well established that HRV is an important prognostic marker of mortality (Malik et al., 1996).

Among several experimental models used to study the pathophysiology of diabetes, non-obese diabetic mice (NOD) have been widely used to evaluate several mechanisms affected by type 1 diabetes. These mice exhibit spontaneous autoimmune diabetes by causing the destruction of insulin producing cells, similar to that observed in humans (Kodama et al., 2003). Furthermore, polydipsia, polyuria, glycosuria, hyperglycemia and insulin deficiency are equally observed in these animals, accompanied by a rapid weight loss (Makino et al., 1980).

* Corresponding author at: Hypertension Unit, Heart Institute (InCor), School of Medicine, University of São Paulo (FMUSP), 44 Dr Eneas de Carvalho Aguiar Avenue, 05403-000 São Paulo/SP, Brazil. Tel.: +55 01126615083.

E-mail addresses: oscaralbuquerque@yahoo.com.br (O.A. Moraes), almadacolucci@gmail.com (J.A. Colucci), expleandro@hotmail.com (L.E. Souza), katiascapini@usp.br (K.B. Scapini), ivanacms.incor@usp.br (I.C. Moraes-Silva), cristiano.mostarda@incor.usp.br (C. Mostarda), prof.kangelis@uninove.br (K. De Angelis), dulce@nefro.epm.br (D.E. Casarini), hipirigoyen@incor.usp.br (M.C. Irigoyen).

¹ These authors contributed equally to this work.

Although the association of diabetes and autonomic dysfunction has been widely recognized, data on cardiovascular autonomic function in NOD mice remain scarce. Therefore, the aim of this study was to investigate the cardiovascular autonomic profile of NOD mice.

2. Methods

2.1. Experimental groups

Groups studied: (1) female hyperglycemic NOD mice ($n = 6$): blood glucose >300 mg/dl (>17 mmol/l); and (2) Swiss female mice ($n = 6$): used as control, blood glucose <110 mg/dl (<6 mmol/l).

All surgical procedures and protocols used were approved by the Nove de Julho University Ethical Committee (protocol number AN0029-2012) and strictly followed National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

2.2. Blood glucose level measurements

Ten-week-old female mice had their blood glucose levels determined weekly using the ACCU-CHECK Sensor® (Roche) until they reached an established level of diabetes. Blood samples were obtained by a vessel puncture in the caudal vein and were used for glucose level determination. Animals with plasma glucose higher than 300 mg/dl were included in this study and Swiss female mice were used as controls (Marco et al., 2008).

2.3. Cardiovascular measurements

When the mice were 24–28 weeks old, they were anesthetized (ketamine–xylazine 80:40 mg/kg ip) and polyethylene-tipped Tygon cannulas (4 cm of PE-08 connected to 2 cm of PE-50, Clay Adams) filled with heparinized saline were inserted into the carotid artery and jugular vein for direct measurements of arterial pressure (AP) and drugs administration, respectively. The free ends of the cannulas were tunneled subcutaneously and exteriorized at the top of the skull. After the surgery, the animals received an intramuscular injection of penicillin G (Benzetacil®, Fontoura-Wyeth, 60,000 U) and postoperative care were based on the description of Flecknell (1992). Two days following catheter placement, hemodynamic measurements were made with animals at baseline conditions, namely, conscious, freely moving, in a quiet environment with controlled temperature, deprived of food and water. The arterial cannula was connected to a transducer (Blood Pressure XDCR, Kent Scientific), and AP signals were recorded for a 20-min period using a micro-computer equipped with an analog-to-digital converter (WINDAQ, 4-kHz sampling frequency, Dataq Instruments). The recorded data were analyzed on a beat-to-beat basis to quantify changes in AP and heart rate (HR).

Baroreflex sensitivity (BRS) was evaluated by a mean index relating the tachycardic and the bradycardic responses for mean AP changes (30–40 mm Hg) induced by increasing doses of sodium nitroprusside (100–250 ng/kg body wt. iv) and phenylephrine (80–250 ng/kg body wt. iv) injections, respectively (De Angelis et al., 2004; Wichi et al., 2007; Heeren et al., 2009). Data were expressed as beats per minute (bpm) per mm Hg. Maximal volume per injection was <25 μ l.

2.4. Heart rate and blood pressure variability

Time-domain analysis consisted in calculating mean pulse interval (PI) variance from its respective time series. For frequency domain analysis, the whole 20-min time series of PI and systolic arterial pressure (SAP), 256 point, overlap 50%, were cubic-spline-interpolated to 27 Hz and decimated to be equally spaced in time. Following linear trend removal, power spectral density was obtained by the fast Fourier transformation as previously described (Soares et al., 2004;

Heeren et al., 2009; Zamo et al., 2010). Spectral power for low (LF 0.10–1.0 Hz), and high (HF 1–5 Hz) frequency bands was calculated by means of power spectrum density integration within each frequency bandwidth, using a customized routine (MATLAB 6.0, Mathworks).

Symbolic analysis of 3-beat sequences to distinguish sympathetic and parasympathetic cardiac modulation was used to detect changes in autonomic modulation of cardiovascular variability (Guzzetti et al., 2005; Porta et al., 2007). RR interval sequences of length $n = 300$ were selected. The full range of the sequences was uniformly spread on 6 levels (from 0 to 5) transforming them into a sequence of integers (i.e., symbols). Patterns (sequences of 3 symbols) were constructed based on the sequence of symbols and all possible patterns were divided into four groups, consisting of patterns with: 1) no variations (0V, three symbols equal that indicate sympathetic modulation); 2) one variation (1V, two consequent symbols were equal and the remaining symbol was different, thus indicating both sympathetic and parasympathetic modulation); 3) two like variations (2LV, with the three symbols forming an ascending or descending ramp, thus indicating parasympathetic modulation); and 4) two unlike variations (2UV, the three symbols forming a peak or a valley, thus indicating parasympathetic modulation (Guzzetti et al., 2005)). The rates of occurrence of these patterns (0V%, 1V%, 2LV%, and 2UV%) were evaluated. All recordings were performed in a sound attenuated room.

2.5. Statistical analysis

Data are reported as mean \pm SEM and Student's *t* test was used to compare means between the two groups. Pearson correlation was used to study the association between variables. The significance level was established as $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Cardiovascular measurements

AP (systolic, diastolic and mean) and HR were not significantly different between NOD and control groups (Table 1). The results of BRS are shown in Fig. 1. There was significant difference between baroreflex bradycardic responses evoked by phenylephrine in NOD group when compared to the control group ($P = 0.036$). Additionally, baroreflex tachycardic responses were significantly lower in NOD group when compared to the control group ($P = 0.027$).

Time and frequency domains of cardiovascular autonomic modulation in NOD and in control groups are shown in Fig. 2. In time domain analysis, the variance of PI was significantly lower in NOD group (21.07 ± 3.75 ms²) as compared to the control group (42.02 ± 6.54 ms², $P = 0.02$). Moreover, RMSSD (root mean square of the successive differences in NN intervals, which is a vagal modulation index) showed significantly lower values in NOD group (4.01 ± 0.32 ms) when compared to the control group (8.28 ± 0.97 ms, $P < 0.01$).

The variance of the SAP was not significantly different between NOD ($n = 6$) and control ($n = 6$) groups (NOD = 18.60 ± 0.71 and C = 20.31 ± 3.16 mm Hg², $P = 0.67$).

Table 1

Arterial pressure and heart rate in control and NOD mice.

Parameters	C ($n = 6$)	NOD ($n = 6$)	P value
SAP (mm Hg)	126 ± 4.7	116 ± 6.4	0.23
MAP (mm Hg)	110 ± 4.3	103 ± 5.2	0.32
DAP (mm Hg)	93 ± 4.2	89 ± 4.0	0.5
HR (bpm)	615 ± 9.0	588 ± 10	0.07

Values are mean \pm SEM obtained by direct measurements of arterial pressure. SAP: systolic arterial pressure; MAP: mean arterial pressure; DAP: diastolic arterial pressure; HR: heart rate;

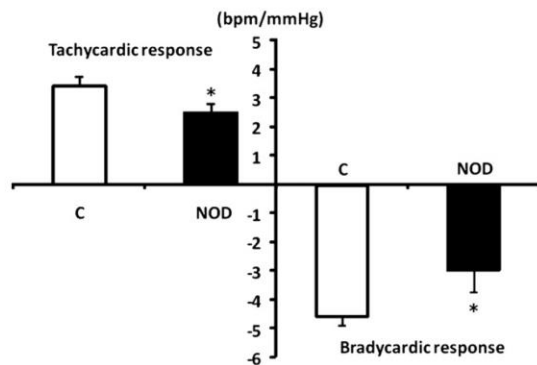


Fig. 1. Baroreflex sensitivity evaluated by tachycardic and bradycardic responses in control ($n = 6$) and NOD mice ($n = 6$). Note that tachycardic and bradycardic responses were significantly lower in NOD when compared with controls animals, showing impairment in the baroreflex sensitivity in NOD mice; Student t test; * $P < 0.05$ compared with control mice.

In frequency domain analysis (Fig. 2), the normalized LF component of the PI, which is representative of the sympathetic modulation to the heart, was significantly enhanced in NOD animals ($61.0 \pm 4.0\%$) when compared to control mice (normalized = $20.0 \pm 4.0\%$, $P < 0.01$). Furthermore, the absolute and normalized HF component of the PI, which are representative of the cardiac vagal modulation, were significantly lower in NOD mice (absolute = $5.29 \pm 5.0 \text{ ms}^2$; normalized = $39 \pm 4\%$) when compared to control mice (absolute = $26.0 \pm 6.0 \text{ ms}^2$, $P = 0.02$; and normalized = $80 \pm 4\%$, $P < 0.01$). Consequently, sympathovagal balance was significantly higher in NOD group than in control group (1.5 ± 0.24 vs. 0.27 ± 0.06 , $P < 0.01$). The sympathetic modulation of SAP (LF component) was not significantly different between NOD and control group (3.13 ± 0.56 vs. $3.29 \pm 0.87 \text{ mm Hg}^2$, $P = 0.87$).

The results of symbolic analysis are shown in Table 2. The 0V pattern, which indicates sympathetic modulation, was significantly higher in NOD than in control group ($P < 0.01$). The 1V pattern was not significantly different between groups. However, parasympathetic modulation, as demonstrated by 2LV pattern, was significantly lower in NOD when compared to the control group ($P < 0.01$), while the 2UV pattern was not significantly different between the groups.

3.2. Correlation analysis

Correlation analyses were carried out associating autonomic parameters and glucose levels. Negative correlations were found between the vagal modulations indexes (HF%, RMSSD and 2LV) and the glycemic levels ($r = -0.88$, $r = -0.87$ and $r = -0.89$, respectively, $P < 0.01$). Furthermore, sympathovagal balance showed a positive correlation with glycemic levels ($r = -0.88$, $P < 0.01$).

4. Discussion

The main finding of the present study was that autonomic dysfunction was found in NOD mice, as demonstrated by different methods and analysis. In contrast to a previous study of the autonomic profile in NOD mice (Gross et al., 2008), we showed BRS impairment and changes in sympathetic and parasympathetic modulation. Furthermore, the autonomic alterations observed in the present study were correlated with glycemic levels. Both the increase in sympathetic activity, as well as the reduction in vagal driving can be associated with higher ectopic events and mortality (Billman, 2009). The study of Colucci et al. (2011) has shown that NOD mice present increased ACE/ACE 2 ratio in the kidney and increased ACE activity in the adrenal

gland, which can contribute to the increased sympathetic modulation. Additionally, decreases in both HRV and BRS are markers of mortality after myocardial infarction (La Rovere et al., 1998).

These changes observed in NOD animals were somehow similar to the ones observed by our group in STZ-diabetic rats. Maeda et al. (1995) have shown a reduction in vagal tonus, maintenance of sympathetic tonus to the heart and decrease in AP and HR. The same alterations were demonstrated by Wegner et al. (1987), suggesting the presence of cardiac vagal neuropathy.

Furthermore, Mostarda et al. (2009) have shown that chronically decreased HRV and vagal modulation in time and frequency domain may be associated with glycemic levels in STZ rats. In this study, NOD mice did not present decrease in AP or in HR, which would suggest minor autonomic dysfunction in this model, when compared to STZ rats. However, further studies are needed to test this hypothesis. BRS was also decreased in NOD mice. In Sprague–Dawley rats treated with STZ, it was showed that elevation in blood glucose levels could lead to a significant change in BRS, even without changes in HR and AP (Hong et al., 2012). These researchers suggest that abnormalities in BRS seem to be closely associated with both the duration and the severity of diabetes.

This relationship has also been demonstrated in humans. In a prospective study, humans with type 1 diabetes, who presented cardiac autonomic neuropathy, showed poor glycemic control (Abd El Dayem et al., 2011). Furthermore, Vinik and Ziegler (2007) have reported that age, poor glycemic control and time of diabetes play a central role in development and progression of cardiovascular autonomic neuropathy. These studies suggest a relationship between glycemic control and autonomic neuropathy; however, it has not been established yet which one precedes the other.

In diabetic NOD mice, insulin deficiency may contribute to a decrease in BRS, since insulin supplementation can modify the changes observed in another experimental diabetes model (Chang and Lund, 1986). Indeed, some studies have demonstrated that the NOD mouse seems to be a valuable model of autonomic neuropathy, which closely corresponds to the characteristic pathology of other rodent models and humans (Schmidt et al., 2003).

The study of Gross et al. (2008) has evaluated the cardiovascular autonomic modulation in diabetic NOD mice using telemetry method. The research evaluated spontaneous BRS in frequency domain by alpha index and did not show baroreflex dysfunction. The researchers suggested that NOD mice do not reflect a clinical and experimental model of diabetes. It should be stressed that in the study of Gross et al. evaluations were carried out before the onset of diabetes and during the 4th week of diabetes. This differs from our study, focused on a more advanced and established phase of diabetes. In this regard, Fazan et al. (1999) evaluated the cardiac autonomic modulation in different stages of STZ-induced diabetes and observed steepest declines in HRV in more advanced stages of diabetes. It should be noted that this model of diabetes does not have a homogeneous progression of the disease, including the increase in glycemic levels (Fu et al., 2012). Therefore, we can speculate that although only diabetic mice have been used in the study, the onset of diabetes may be different among the animals, thus altering the period of a possible autonomic compensation. In other words, in a early phase of diabetes progression in this model, autonomic function may be normal, as demonstrated by other authors in STZ rats (Schaan et al., 1997) or clearly altered as seen in the present study and in other studies from our group using different models of diabetes (Maeda et al., 1995; Dall'Ago et al., 2002; De Angelis et al., 2012).

Finally, cardiovascular autonomic function in this model must be further investigated over time and at different phases, as the autonomic function is an important marker of cardiovascular morbidity and mortality (La Rovere et al., 1998). Additionally, in many studies autonomic neuropathy has been shown to be a predictor of increased mortality (Maser et al., 2003; Vinik and Ziegler, 2007).

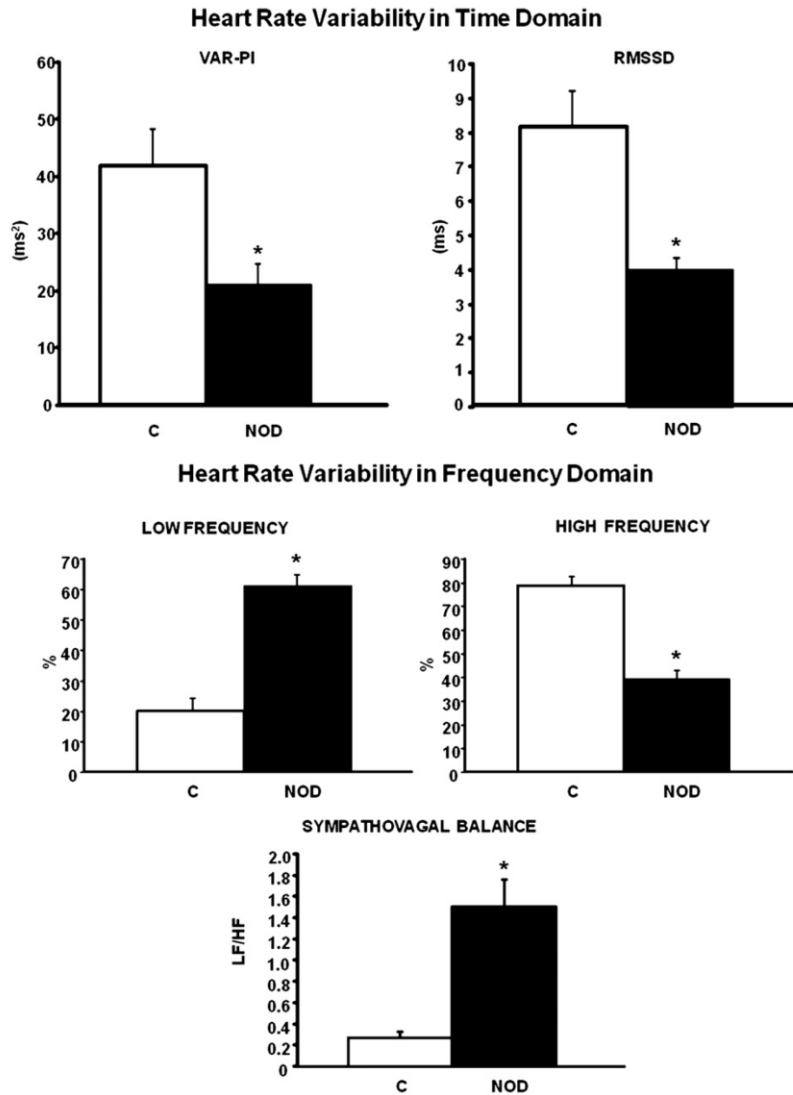


Fig. 2. Indices of HRV in the time (Var-PI and RMSSD) and frequency domain (normalized components and sympathovagal balance) between control ($n = 6$) and NOD mice ($n = 6$). Note in the top panel that variability of pulse interval (VAR-PI) and RMSSD were significantly lower in NOD when compared with control mice, showing reduction of heart rate variability in NOD mice. In the bottom panel note that low frequency component was significantly higher in NOD mice while the high frequency component was significantly lower in these animals, showing, respectively, increased in sympathetic and reduction in parasympathetic cardiac modulation, which was evidenced for increased sympathovagal balance in NOD when compared with control mice; Student t test; * $P < 0.05$ compared with control mice.

Table 2

Symbolic analysis in control and NOD mice.

Parameters	C ($n = 6$)	NOD ($n = 6$)	P value
0V pattern	6.06 \pm 0.90	11.90 \pm 1.40*	<0.01
1V pattern	34.52 \pm 3.90	40.39 \pm 3.18	0.27
2LV pattern	21.20 \pm 3.36	7.98 \pm 1.30*	<0.01
2UV pattern	38.33 \pm 1.70	39.63 \pm 4.48	0.80

Values are mean \pm SEM obtained by symbolic analysis of heart rate variability in control and NOD mice. 0V: three symbols equal that indicate sympathetic modulation; 1V: one variation, two symbols equal and one different, that indicate both sympathetic and parasympathetic modulation; 2LV: two like variations that indicate parasympathetic modulation; 2UV: two unlike variations that indicate parasympathetic modulation. Student t test.

* $P < 0.05$ vs. C.

5. Conclusions

Grounded on the methods adopted in this study and on our focus on the age and the phase of diabetes progression, we may suggest that the NOD mice present autonomic function impairment, probably related to their glycemic levels.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

References

- Abd El Dayem, S.M., Battah, A.A., Soliman, R.A., 2011. Natural progression of cardiac autonomic neuropathy in patients with type 1 diabetes: a four-year follow-up study. *Anadolu Kardiyol. Derg.* 11, 224–231.

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN0029-2012

Título do Projeto: Mecanismos associados ao desenvolvimento das complicações do diabetes tipo 1 em camundongos não obeso diabéticos (NOD)

Orientador: **Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen**

Aluno: **Oscar Albuquerque de Moraes**

Objetivos:

hemodinâmico

O objetivo do presente estudo será avaliar o papel do treinamento físico aeróbio no desenvolvimento do diabetes tipo 1 em camundongos não obesos diabéticos (NOD) analisado os seguintes parâmetros:

- ✓ **metabólicos:** peso corporal; glicose, insulina, triglicérides e colesterol total sanguíneos; e índice GTT;
- ✓ **de capacidade funcional:** teste de esforço máximo;
- ✓ **hemodinâmicos:** pressão arterial e frequência cardíaca;
- ✓ **autônômicos:** sensibilidade barorreflexa; variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial;
- ✓ **Avaliações ecocardiográficas:** Morfometria, função sistólica;
- ✓ **Avaliações de estresse oxidativo:** lipoperoxidação de membrana, atividade das enzimas glutatona peroxidase superóxido dismutase, concentração da enzima catalase e balanço redox (GSH/GSSG) nos tecidos cardíaco e renal;
- ✓ **Curva de Mortalidade** (Kaplan Meier)

Método:

Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo):

Serão utilizados camundongos fêmeas, não obesos diabéticos (NOD), com 8 semanas de idade, provenientes do biotério da Universidade Federal de São Paulo, que serão mantidos no Biotério da divisão de Hipertensão Experimental, Incor, FMUSP. No total serão 28 animais (07 por grupo).

Condições de alojamento e nutrição: Os animais serão mantidos em gaiolas, contendo no máximo 06 animais por caixa, em ambiente com temperatura controlada (22° - 24°C) e com luz controlada em ciclo de 12 horas (claro - escuro, invertido) e alimentados com água e ração padrão "ad libitum".

O n foi justificado pelo cálculo de n amostral considerando a pressão arterial. No formulário foi descrito referências de trabalhos publicados semelhantes à proposição deste trabalho.

- Billman, G.E., 2009. Cardiac autonomic neural remodeling and susceptibility to sudden cardiac death: effect of endurance exercise training. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H1171–H1193.
- Chang, K.S., Lund, D.D., 1986. Alterations in the baroreceptor reflex control of heart rate in streptozotocin diabetic rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 18, 617–624.
- Colucci, J.A., Yuri Arita, D., Sousa Cunha, T., Seno Di Marco, G., Vio, C.P., Pacheco-Silva, A., Casarini, D.E., 2011. Renin-angiotensin system may trigger kidney damage in NOD mice. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 12, 15–22.
- Dall'Ago, P., Silva, V.O., De Angelis, K.L., Irigoyen, M.C., Fazan Jr., R., Salgado, H.C., 2002. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 843–849.
- De Angelis, K., Wichi, R.B., Jesus, W.R., Moreira, E.D., Morris, M., Krieger, E.M., Irigoyen, M.C., 2004. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. *J. Appl. Physiol.* 96, 2174–2178.
- De Angelis, K., Senador, D.D., Mostarda, C., Irigoyen, M.C., Morris, M., 2012. Sympathetic overactivity precedes metabolic dysfunction in a fructose model of glucose intolerance in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 302, R950–R957.
- Fazan Jr., R., Dias da Silva, V.J., Ballejo, G., Salgado, H.C., 1999. Power spectra of arterial pressure and heart rate in streptozotocin-induced diabetes in rats. *J. Hypertens.* 17, 489–495.
- Flecknell, P.A., 1992. The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the relief of pain in laboratory rodents and rabbits. *Lab. Anim.* 26, 241–255.
- Fu, W., Wojtkiewicz, G., Weissleder, R., Benoist, C., Mathis, D., 2012. Early window of diabetes determinism in NOD mice, dependent on the complement receptor CR1g, identified by noninvasive imaging. *Nat. Immunol.* 13, 361–368.
- Gross, V., Tank, J., Partke, H.J., Plehm, R., Diedrich, A., da Costa Goncalves, A.C., Luft, F.C., Jordan, J., 2008. Cardiovascular autonomic regulation in non-obese diabetic (NOD) mice. *Auton. Neurosci.* 138, 108–113.
- Guzzetti, S., Borroni, E., Garbelli, P.E., Ceriani, E., Della Bella, P., Montano, N., Cogliati, C., Somers, V.K., Malliani, A., Porta, A., 2005. Symbolic dynamics of heart rate variability: a probe to investigate cardiac autonomic modulation. *Circulation* 112, 465–470.
- Heeren, M.V., De Sousa, L.E., Mostarda, C., Moreira, E., Machert, H., Rigatto, K.V., Wichi, R.B., Irigoyen, M.C., De Angelis, K., 2009. Exercise improves cardiovascular control in a model of dyslipidemia and menopause. *Maturitas* 62, 200–204.
- Hong, L.Z., Chan, Y.C., Wang, M.F., Wang, J.Y., Hung, S.W., Tsai, C.L., Tseng, C.J., 2012. Modulation of baroreflex function by rosiglitazone in prediabetic hyperglycemic rats. *Physiol. Res.* 61, 443–452.
- Jorge, L., da Pureza, D.Y., da Silva Dias, D., Conti, F.F., Irigoyen, M.C., De Angelis, K., 2012. Dynamic aerobic exercise induces baroreflex improvement in diabetic rats. *Exp. Diabetes Res.* 108680.
- Kodama, S., Kuhntreiber, W., Fujimura, S., Dale, E.A., Faustman, D.L., 2003. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. *Science* 302, 1223–1227.
- La Rovere, M.T., Bigger Jr., J.T., Marcus, F.I., Mortara, A., Schwartz, P.J., 1998. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) investigators. *Lancet* 351, 478–484.
- Maeda, C.Y., Fernandes, T.G., Timm, H.B., Irigoyen, M.C., 1995. Autonomic dysfunction in short-term experimental diabetes. *Hypertension* 26, 1100–1104.
- Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K., Tochino, Y., 1980. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 29, 1–13.
- Malik, M., Bigge, J.T., Camm, A.J., Kleiger, R.E., Malliani, A., Moss, A.J., Schwartz, P.J., 1996. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur. Heart J.* 17, 354–381.
- Marco, G.S., Colucci, J.A., Fernandes, F.B., Vio, C.P., Schor, N., Casarini, D.E., 2008. Diabetes induces changes of catecholamines in primary mesangial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 747–754.
- Maser, R.E., Mitchell, B.D., Vinik, A.J., Freeman, R., 2003. The association between cardiovascular autonomic neuropathy and mortality in individuals with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 26, 1895–1901.
- Mostarda, C., Rogow, A., Silva, I.C., De La Fuente, R.N., Jorge, L., Rodrigues, B., Heeren, M.V., Caldini, E.G., De Angelis, K., Irigoyen, M.C., 2009. Benefits of exercise training in diabetic rats persist after three weeks of detraining. *Auton. Neurosci.* 145, 11–16.
- Porta, A., Tobaldini, E., Guzzetti, S., Furlan, R., Montano, N., Gnecchi-Ruscone, T., 2007. Assessment of cardiac autonomic modulation during graded head-up tilt by symbolic analysis of heart rate variability. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H702–H708.
- Schaan, B.D., Maeda, C.Y., Timm, H.B., Medeiros, S., Moraes, R.S., Ferlin, E., Fernandes, T.G., Ribeiro, J.P., Schmid, H., Irigoyen, M.C., 1997. Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in streptozotocin-induced diabetic rats treated with insulin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 1081–1086.
- Schmidt, R.E., 2002. Neuropathology and pathogenesis of diabetic autonomic neuropathy. *Int. Rev. Neurobiol.* 50, 257–292.
- Schmidt, R.E., Dorsey, D.A., Beaudet, L.N., Frederick, K.E., Parvin, C.A., Plurad, S.B., Levisetti, M.G., 2003. Non-obese diabetic mice rapidly develop dramatic sympathetic neuritic dystrophy: a new experimental model of diabetic autonomic neuropathy. *Am. J. Pathol.* 163, 2077–2091.
- Schumer, M.P., Joyner, S.A., Pfeifer, M.A., 1998. Cardiovascular autonomic neuropathy testing in patients with diabetes. *Diabetes Spectr.* 11, 227–231.
- Soares, P.P., da Nobrega, A.C., Ushizima, M.R., Irigoyen, M.C., 2004. Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. *Auton. Neurosci.* 113, 24–31.
- Vinik, A.I., Ziegler, D., 2007. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Circulation* 115, 387–397.
- Wegner, J.A., Lund, D.D., Overton, J.M., Edwards, J.G., Oda, R.P., Tipton, C.M., 1987. Select cardiovascular and metabolic responses of diabetic rats to moderate exercise training. *Med. Sci. Sports Exerc.* 19, 497–503.
- Wichi, R., Malfitano, C., Rosa, K., De Souza, S.B., Salemi, V., Mostarda, C., De Angelis, K., Irigoyen, M.C., 2007. Noninvasive and invasive evaluation of cardiac dysfunction in experimental diabetes in rodents. *Cardiovasc. Diabetol.* 6, 14.
- Zamo, F.S., Lacchini, S., Mostarda, C., Chiavegatto, S., Silva, I.C., Oliveira, E.M., Irigoyen, M.C., 2010. Hemodynamic, morphometric and autonomic patterns in hypertensive rats — renin-angiotensin system modulation. *Clinics (Sao Paulo)* 65, 85–92.
- Zimmet, P.Z., McCarty, D.J., de Courten, M.P., 1997. The global epidemiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *J. Diabetes Complications* 11, 60–68.

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN0029-2012

Título do Projeto: Mecanismos associados ao desenvolvimento das complicações do diabetes tipo 1 em camundongos não obeso diabéticos (NOD)

Orientador: **Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen**

Aluno: **Oscar Albuquerque de Moraes**

Objetivos:

hemodinâmico

O objetivo do presente estudo será avaliar o papel do treinamento físico aeróbio no desenvolvimento do diabetes tipo 1 em camundongos não obesos diabéticos (NOD) analisado os seguintes parâmetros:

- ✓ **metabólicos:** peso corporal; glicose, insulina, triglicérides e colesterol total sanguíneos; e índice GTT;
- ✓ **de capacidade funcional:** teste de esforço máximo;
- ✓ **hemodinâmicos:** pressão arterial e frequência cardíaca;
- ✓ **autônômicos:** sensibilidade barorreflexa; variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial;
- ✓ **Avaliações ecocardiográficas:** Morfometria, função sistólica;
- ✓ **Avaliações de estresse oxidativo:** lipoperoxidação de membrana, atividade das enzimas glutatona peroxidase superóxido dismutase, concentração da enzima catalase e balanço redox (GSH/GSSG) nos tecidos cardíaco e renal;
- ✓ **Curva de Mortalidade** (Kaplan Meier)

Método:

Animais (procedência, raça, linhagem, número de animais, peso, sexo):

Serão utilizados camundongos fêmeas, não obesos diabéticos (NOD), com 8 semanas de idade, provenientes do biotério da Universidade Federal de São Paulo, que serão mantidos no Biotério da divisão de Hipertensão Experimental, Incor, FMUSP. No total serão 28 animais (07 por grupo).

Condições de alojamento e nutrição: Os animais serão mantidos em gaiolas, contendo no máximo 06 animais por caixa, em ambiente com temperatura controlada (22° - 24°C) e com luz controlada em ciclo de 12 horas (claro - escuro, invertido) e alimentados com água e ração padrão "ad libitum".

O n foi justificado pelo cálculo de n amostral considerando a pressão arterial. No formulário foi descrito referências de trabalhos publicados semelhantes à proposição deste trabalho.

Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais:

Canulação - Após o período de treinamento ou acompanhamento, os animais serão anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (120:20 mg/Kg im) e mantidos em mesa cirúrgica aquecida (37° C) para colocação de cânulas na artéria carótida para registro da PA e da FC e, na veia jugular, para a injeção de drogas. Os camundongos anestesiados serão colocados em decúbito dorsal e será realizada uma incisão mediana na região cervical e separação da musculatura pré-traqueal para localização da veia jugular e a artéria carótida. Serão implantadas cânulas de Tygon (0,05 mm de diâmetro interno), com 3,0 cm de comprimento, soldadas a um segmento de Cloreto de Polivinila (0,05 mm de diâmetro interno), com 4,0 cm de comprimento e preenchidas com solução fisiológica. A extremidade de cloreto de polivinila será introduzida e fixada no vaso e a extremidade de Tygon será exteriorizada no dorso do animal na região cervical e fixada com fio de polipropileno na pele. Com o animal acordado, a cânula arterial será conectada a uma extensão de 20 cm, permitindo livre movimentação do animal pela caixa, durante todo o período do experimento. Esta extensão será conectada a um transdutor eletromagnético de pressão (Kent Instruments) que, por sua vez, estará conectado a um pré-amplificador (Stemtech). Sinais de PA serão gravados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (CODAS, DATAQ Instruments), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 2KHz por canal para estudo dos valores de PA e FC (DE ANGELIS et al., 1999; DE ANGELIS et al., 2000; DE ANGELIS et al., 2004; HEEREN et al., 2010).

Medida da Glicemia Sanguínea - Os animais serão submetidos a jejum de 4 horas e, após será retirada uma gota de sangue da cauda para análise da glicose pelo glicosímetro (Accucheck, Roche).

Será realizada utilizando uma injeção intraperitoneal de glicose (1,5g/Kg). Os animais serão mantidos em jejum por 6 horas e amostras de sangue serão tiradas da cauda do animal antes e após 15, 30 e 60 minutos após a administração de glicose.

Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração): Não procede.

Eutanásia:

Os animais serão eutanasiados por decapitação.

O coordenador do projeto declarou que os procedimentos utilizados no projeto são de domínio do grupo de pesquisa, comprovado pelas publicações de artigos internacionais. Os alunos recebem formação e treinamento para os procedimentos. O grupo possui guilhotina obtida de projeto FAPESP.

Pertinência e valor científico do estudo proposto:

O Projeto é da expertise da pesquisadora e não foram encontradas questões éticas conflitantes no projeto.



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – UNINOVE
Rua Francisco Matarazzo, no 612, Prédio C, Diretoria da Saúde
ceua@uninove.br

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN0029-2012

Título do Projeto: Mecanismos associados ao desenvolvimento das complicações do diabetes tipo 1 em camundongos não obeso diabéticos (NOD)

Orientador: Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen

Aluno: Oscar Albuquerque de Moraes

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

- Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.
- Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.
- Não-Aprovado

São Paulo, 26 de setembro de 2012

Prof. Dra. Maria Antonietta Leitão Zajaç
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da
Universidade Nove de Julho