



**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**

**Programa de Pós-Graduação *Strito Sensu* em Medicina**

**Efeitos da reposição com insulina nas disfunções cardiometabólicas  
induzidas pelo diabetes experimental por estreptozotocina**

**Aluna: Sarah Cristina Ferreira Freitas**

**Orientadora: Profa. Dra. Kátia De Angelis**

**São Paulo**

**2016**

**Sarah Cristina Ferreira Freitas**

Efeitos da reposição com insulina nas disfunções cardiometabólicas  
induzidas pelo diabetes experimental por estreptozotocina

Effects of insulin replacement on cardiometabolic dysfunctions  
induced by experimental streptozotocin diabetes

Dissertação apresentada à Universidade  
Nove de Julho para obtenção do título de  
mestre em Medicina

**Programa de pós-graduação:** Mestrado em  
Medicina

**Orientadora:** Profa. Dra. Kátia De Angelis  
Lobo D'Ávila

São Paulo, Fevereiro de 2016.

***Freitas, Sarah Cristina Ferreira.***

***Efeitos da reposição com insulina nas disfunções cardiometabólicas induzidas pelo diabetes experimental por estreptozotocina./ Sarah Cristina Ferreira Freitas. 2016.***

***88 f.***

***Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2016.***

***Orientador (a): Profa. Dra. Kátia De Angelis.***

***1. Diabetes tipo1. 2. Ratos. 3. STZ. 4. Tratamento com insulina. 5. Função autonômica. 6. Sensibilidade barorreflexa. 7. Função cardíaca. 8.***

São Paulo, 25 de fevereiro de 2016.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluna: **Sarah Cristina Ferreira Freitas**

Título da Dissertação: “**Efeitos da reposição com insulina nas disfunções cardiométrabólicas induzidas pelo diabetes experimental por estreptozotocina**”.

Presidente: Profa. Dra. Kátia de Angelis K. Angelis

Membro: Profa. Dra. Silvia Lacchini Silvia Lacchini

Membro: Prof. Dr. Humberto Dellê Humberto Dellê

## Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, **Sebastião Neves de Freitas e Tânia Maria Ferreira Freitas**, por seu amor, sua atenção e ensinamentos que me guiaram durante a minha vida e me possibilitaram alcançar todas as conquistas que já tive o prazer de desfrutar, inclusive essa. Me possibilitaram ser a pessoa que sou e ter as metas e sonhos que me dedico atualmente, sempre me apoiando e não poupando esforços para me ajudar.

Dedico ao meu pai em especial, pelo seu sonho de fazer ciência e todo seu interesse pela área científica e pelo conhecimento. Pelas interessantes conversas e suas diversas teorias e pensamentos. Devo dedicar a minha mãe em particular também, por ser uma professora e ter me ensinado a amar essa área e a importância de uma boa transmissão do conhecimento.

Dedico à Profa. Dra. **Kátia De Angelis** por todos os ensinamentos, tempo despendido e pelo grande exemplo que ela me oferece. Dedico também a Profa. Dra. **Iris Callado Sanches**, não só por todos os conselhos, ajuda e grande conhecimento que me proporcionou, mas principalmente pela sua amizade.

Dedico ao meu irmão, **Vinícius Otávio Ferreira Freitas**, por ser o melhor irmão que Deus poderia ter me dado. Por ser aquele que me ensina e me fala coisas que mudam minha visão da vida.

Dedico a todos os meus amigos pelo grande apoio, principalmente psicológico durante todas as fases, me escutando, me fazendo rir e estando ao meu lado.

Dedico à minha família, **Ferreira e Freitas**, por todo o amor e colaboração na minha formação e por sempre terem acreditado em mim.

Dedico por último e não menos importante a Deus, pela oportunidade que me deu de conhecer todas as pessoas acima e também por ter me proporcionado poder estudar e conhecer mais sobre esse campo da vida que é fazer ciência.

## Agradecimentos

Inicialmente agradeço à Deus, por sua incessante proteção. Ao meu anjo da guarda, por ser um guerreiro. À todas as entidades religiosas, sendo católicas ou não, acredito que iluminam e guiam nosso caminho.

Agradeço às caronas do meu pai. Aos almoços da minha mãe. Aos dias e principalmente tardes de fim de semana que eles perdiam me trazendo e buscando na universidade. Agradeço de forma inquestionável a eles dois, por toda ajuda e apoio em absolutamente tudo que fosse necessário em todos os momentos da minha vida. Devo agradecer extensivamente, a todos meus familiares que de alguma forma e sempre com grande dedicação contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Agradeço à Profa. Dra. Kátia De Angelis, por ter sido uma orientadora excepcional, sempre solucionando minhas dúvidas e problemas. Pelo tempo dedicado a mim. Pela compreensão. Pelos ensinamentos e por ser um exemplo maior na minha vida do que acredito que ela saiba.

Agradeço à Profa. Dra. Iris Callado Sanches. Dizem que Deus coloca anjos no nosso caminho e você sem dúvida foi um que me foi possibilitado conhecer. Agradeço por ter me guiado e me ensinado sem restrições em todos os momentos e dificuldades desse trabalho. Agradeço por ser essa pessoa tão maravilhosa que você é e por ter me dado sua amizade. Esse trabalho não teria sido finalizado sem sua presença e colaboração.

Agradeço ao meu irmão, pelas conversas sem sentido, pelas risadas durante as noites, por todos os conselhos e por sua forma incrivelmente prática de ver as coisas.

Agradeço aos meus amigos, em especial a Camila e a Marina, que desde o ensino fundamental me proporcionam momentos de grande felicidade. Agradeço ao André aquele que adorava criticar meus ratinhos, apesar de os adorar tanto quanto eu. Agradeço à Flávia pelas ótimas conversas, por adorar ouvir histórias do meu protocolo e compartilhar comigo de meus sentimentos.

Agradeço a todos os professores do curso que sempre foram muito solícitos, gentis e educados. Em especial aqueles com quem tive aulas, por terem me ajudado a entender mais sobre essa área que estudo e trabalho.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Fisiologia Translacional, por toda a ajuda e companhia ao longo do meu protocolo, o qual não seria possível realizar sem eles.

Agradeço ao Instituto do Coração e à Profa. Dra. Maria-Claudia Irigoyen que proporcionaram acesso ao aparelho e estrutura para as análises ecocardiográficas, assim como ao Prof. Dr. Paulo Magno Martins Dourado por disponibilizar tempo e dedicação no auxílio da aquisição e interpretação desses dados.

Agradeço a todos os funcionários da Universidade Nove de Julho que de forma direta ou indireta colaboraram para a finalização desse trabalho, desde os encarregados da segurança que me possibilitavam entrar na UNINOVE quando necessário, as encarregadas da limpeza que dividiram horas de trabalho comigo em fins de semana e feriados e aos funcionários do biotério por sua atenção e cuidado. Despendido

Agradeço à Universidade Nove de Julho pela oportunidade de fazer esse curso, conhecer essas pessoas e ampliar meu conhecimento. Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro, que me possibilitou dedicar exclusivamente à finalização do meu Mestrado em Medicina.

Por último gostaria de agradecer de forma bastante importante também, aos animais que contribuíram com a coleta e aquisição desses dados. Todos eles que me acompanharam durante dias e que com alguma certeza posso dizer que depositaram em mim, o mesmo sentimento de companheirismo e afeição que depositei neles.

## RESUMO

Estudos evidenciam que portadores de diabetes tipo 1 apresentam risco de mortalidade cardiovascular aumentado em relação à normoglicêmicos, mesmo quando mantidos sob bom controle glicêmico. No entanto, os mecanismos envolvidos nesta condição não são bem compreendidos. O modelo de diabetes por estreptozotocina (STZ) tem sido muito utilizado para o estudo das complicações crônicas do diabetes, porém normalmente os animais são mantidos sem reposição de insulina e, portanto, com glicemia muito elevada. Desta forma, esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos da terapia de reposição insulínica em parâmetros cardíacos, autonômicos e de estresse oxidativo (EO) em um modelo de DM tipo 1 induzido por STZ. Para isso, foram utilizados ratos Wistar machos (230-260g) que foram divididos em 3 grupos ( $n=8/\text{grupo}$ ): controle (C), diabético (D, STZ 50mg/kg) e diabéticos tratados diariamente com insulina (2U de manhã e 4U à tarde, sc) (DTI). A glicemia foi mensurada semanalmente. Em 15 e 30 dias foram feitas avaliações em gaiola metabólica. Aos 30 dias, a função cardíaca foi avaliada por ecocardiograma. No dia seguinte, os animais foram canulados e foi avaliada a sensibilidade do barorreflexo e o tônus autonômico cardíaco, assim como a modulação autonômica cardiovascular. A análise do EO foi realizada nos tecidos cardíaco e renal. Os grupos diabéticos apresentaram hiperglicemias ( $>350\text{mg/dL}$ ) no início do protocolo. A terapia com insulina normalizou a glicemia, bem como a poliúria, polifagia e polidipsia observada no grupo D. Houve redução na massa do ventrículo esquerdo no grupo D e essa mudança não foi observada no grupo DTI. Observou-se comprometimento da função sistólica (fração de encurtamento) no grupo D que foi revertida com tratamento com insulina (DTI). Quanto à função diastólica, o tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido estava aumentado e relação E/A estava reduzida no grupo D e DTI em relação ao grupo C. O tratamento com insulina normalizou a pressão arterial (PA), a frequência cardíaca (FC), a FC intrínseca, bem como o tônus vagal e simpático e a variabilidade da FC que estavam prejudicados no grupo D. A sensibilidade do barorreflexo, para as respostas bradicárdica e taquicárdica, e a variabilidade da PA estavam prejudicadas no grupo D em relação ao C. A disfunção na resposta taquicárdica e na variabilidade da PA não foram normalizada pelo tratamento com insulina. Na análise de EO, o grupo D teve maior glutatona oxidada e reduzida no coração e aumento da lipoperoxidação em tecido cardíaco e renal, o que não foi observado no grupo tratado com insulina. Nossos achados confirmam disfunção metabólica, cardiovascular e autonômica, além de alteração em tecido renal, em ratos diabéticos por STZ, o que foi parcialmente

revertido pelo tratamento com insulina por 30 dias. Todavia, o resultado mais importante observado, foi que o tratamento com insulina não foi capaz de reverter a disfunção diastólica, do barorreflexo e da variância da PAS, sugerindo um risco cardiovascular remanescente mesmo após a obtenção de um bom controle glicêmico neste modelo experimental de diabetes tipo 1.

**Descritores:** Diabetes tipo 1, ratos, STZ, tratamento com insulina, função autonômica, sensibilidade barorreflexa, função cardíaca, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Studies show that people with type 1 diabetes presented increased cardiovascular mortality risk compared to normoglycemic, even when kept under good glycemic control. However, the mechanisms involved in this condition are not well understood. The model of diabetes by streptozotocin (STZ) has extensively been used for the study of chronic complications of diabetes, but usually the animals are kept without insulin replacement and therefore with very high glucose levels. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of insulin replacement therapy on cardiac, autonomic and oxidative stress (OS) parameters in a model of type 1 DM induced by STZ. For this, Wistar rats (230-260g) were divided into 3 groups ( $n=8/\text{group}$ ): control (C), diabetic (D, streptozotocin 50mg/kg), and diabetic treated daily with insulin (2U morning and 4U afternoon, sc) (DTI). Blood glucose was measured weekly. Metabolic cage evaluations were performed on 15 and 30 days of protocol. At 30 days of protocol, the cardiac function was assessed by echocardiography. On the day before, the animals were cannulated and baroreflex sensitivity and cardiac autonomic tone were evaluated, as well as cardiovascular autonomic modulation. The EO analysis were performed in the cardiac and renal tissues. The diabetic groups showed hyperglycemia ( $>350\text{mg/dL}$ ) at the beginning of the protocol. Insulin therapy normalized glycaemia, as well as polyuria, polydipsia, and polyphagia observed in D group. There was a reduction in left ventricular mass in D group and this change was not observed in the DTI group. There was impairment of systolic function (fractional shortening) in D group that was reversed with insulin treatment (DTI). Regarding diastolic function, the corrected isovolumetric relaxation time was increased and the E/A ratio was reduced in D and DTI groups compared to C group. Treatment with insulin normalized arterial pressure (AP), heart rate (HR), the intrinsic HR and vagal and sympathetic tone and HR variability that were impaired in D group. The baroreflex sensitivity, for bradycardic and tachycardic responses, and the systolic AP variability were impaired in D compared to C group. The dysfunction in tachycardic response and in AP variability has not been normalized by treatment with insulin. In the OS analysis, D group had more oxidized and reduced glutathione in the heart and increased lipid peroxidation in cardiac and renal tissues, which were not observed in the insulin-treated group. Our findings confirm metabolic, cardiovascular and autonomic dysfunctions, and changes in renal tissue, in STZ induceddiabetic rats. These changes were partially attenuated by treatment with insulin for 30 days.. However, the most important result observed was that the insulin treatment was not able to reverse the dysfunctions in cardiac diastole, baroreflex and systolic AP variability, suggesting a remaining cardiovascular risk even under good glycemic control in this experimental model of type 1 diabetes.

**Key words:** Type 1 diabetes, Rats, STZ-induced diabetes, Insulin treatment, Autonomic function, Baroreflex sensitivity, Cardiac function, Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Glicemia dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) no início e ao longo do protocolo. ....	23
<b>Figura 2.</b> Glicemia durante as 4 semanas de protocolo dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) ao longo dos 30 dias de protocolo.....	24
<b>Figura 3.</b> Variação da massa corporal em gramas depois de 30 dias de protocolo, por animal, nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI).....	24
<b>Figura 4.</b> Massa corporal ao longo das 4 semanas de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI). .....	26
<b>Figura 5.</b> Espessura relativa de parede nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. ....	28
<b>Figura 6.</b> Massa do ventrículo esquerdo fórmula corrigida em gramas dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. ....	28
<b>Figura 7.</b> Fração de encurtamento em porcentagem nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. ....	29
<b>Figura 8.</b> Tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. ....	30
<b>Figura 9.</b> Tempo de desaceleração da onda E nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. Figura 9A: valores absolutos. Figura 9B: valores corrigidos pelo intervalo R-R.....	30
<b>Figura 10.</b> Índice de performance miocárdica nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. ....	31
<b>Figura 11.</b> Pressão arterial (PA) nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. Figura 8A: PA sistólica. Figura 8B: PA diastólica. Figura 8C: PA média.....	32
<b>Figura 12.</b> Frequência cardíaca (FC) no repouso dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. ....	32
<b>Figura 13.</b> Sensibilidade dos barorreceptores, avaliada pelas respostas bradicárdicas e taquicárdicas, nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. ....	33
<b>Figura 14.</b> Frequência cardíaca intrínseca nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. ....	34

<b>Figura 15.</b> Controle autonômico nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. Figura 15A: Tônus vagal. Figura 15B: Tônus simpático. ....	34
<b>Figura 16.</b> Variância do intervalo de pulso nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. ....	35
<b>Figura 17.</b> Variância da pressão arterial sistólica nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. ....	36
<b>Figura 18.</b> Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no ventrículo esquerdo (VE) nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo.....	37
<b>Figura 19.</b> Glutationa reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) no ventrículo esquerdo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. ....	38
<b>Figura 20.</b> Capacidade antioxidante total (TRAP) no ventrículo esquerdo (VE) nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. ....	39
<b>Figura 21.</b> Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tecido renal nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. ....	40

## LISTA DE TABELAS

..... 11

<b>Tabela 1</b> - Glicemia dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) no início e durante as 4 semanas de protocolo .....	22
<b>Tabela 2</b> – Massa corporal dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) no início e nas semanas de protocolo .....	24
<b>Tabela 3</b> – Parâmetros avaliados na gaiola metabólica nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) em 15 e 30 dias de protocolo.....	25
<b>Tabela 4</b> – Morfometria cardíaca após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) .....	26
<b>Tabela 5</b> – Funções sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo avaliadas pelo ecocardiograma após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) .....	28
<b>Tabela 6</b> – Pressão arterial sistólica e diastólica após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI).....	30
<b>Tabela 7</b> – Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e no domínio da frequência após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI).....	34
<b>Tabela 8</b> – Variabilidade da pressão arterial sistólica no domínio do tempo e no domínio da frequência após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI).....	35
<b>Tabela 9</b> – Medida de lipoperoxidação por quimiluminescência (QL), por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e oxidação de proteínas por carbonilas no ventrículo esquerdo após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) .....	36
<b>Tabela 10</b> – Atividade de enzimas antioxidantes no ventrículo esquerdo após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) .....	37
<b>Tabela 11</b> – Medida de lipoperoxidação por quimiluminescência (QL), por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e oxidação de proteínas por carbonilas em tecido renal após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI).....	38
<b>Tabela 12</b> – Atividade da glutationa peroxidase (GPx) em tecido renal após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI). ....	39
<b>Tabela 13</b> – Capacidade antioxidant total (TRAP) em tecido renal nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo ....	40

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ABAP: 2,2' Azo-bis(2-amidino-propano) diidrocloreto

ADP: Adenosina difosfato

ATP: Adenosina trifosfato

AF: Banda de alta frequência

BF: Banda de baixa frequência

Brg1: Brahma-related gene 1

C: Controle

CAT: Catalase

CEUA: Comitê de ética no uso de animais

CMPDD: Cardiomiotropia diabética dilatada

D: Diabético

DCCT/EDIC: Estudo de controle de complicações do diabetes e epidemiologia de intervenções e complicações do diabetes (do inglês, *The Diabetes Control and Complications Trial and Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*)

dDiaVE: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

DM: Diabetes *mellitus*

DNPH: Dinitrofenil hidrazina

DTI: Diabético tratado com insulina

EROs: Espécies reativas de oxigênio

ERONs: Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

ERP: Espessura relativa de parede

FC: Frequência cardíaca

FFT: Transformada rápida de Fourier

GPx: Glutatona peroxidase

GSH: Glutatona reduzida

GSH total: Glutatona total

GSH/GSSG: Razão entre glutatona reduzida e oxidada

GSSG: Glutatona oxidada

HbA1c: Hemoglobina glicada

HDL: Lipoproteína de alta densidade (do inglês, *high-density lipoprotein*)

IC: Insuficiência cardíaca

IL: Interleucina

IPM: Índice de performance miocárdica

IRS-1: Substrato do receptor de insulina1

LDL: Lipoproteína de baixa densidade (do inglês, *low-density lipoprotein*)

LPO: lipoperoxidação

MBF: Banda de muito baixa frequência

MVE: Massa do ventrículo esquerdo

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

NF-kb: Fator nuclear kappa beta

NOS: Óxido nítrico sintase

NOX: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase

NPH: Protamina neutra de Hagedorn

Nrf2: Fator nuclear (derivado de eritroide-2) tipo 2

O-GlcNAc:Ligação de N-acetylglucosamina ao oxigênio

O-GlcNAcase: N-acetil-beta-d-glucosaminidase seletiva para ligação de Nacetilglucosamina ao oxigênio PA: Pressão arterial PAM: Pressão arterial média PAS: Pressão arterial sistólica PCR: Proteína C reativa PE: Polietileno PGA: Produtos finais de glicação avançada PI3-quinase: Fosfoinositídeo 3-quinase PPVEDia: Parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole QL: Quimiluminescência Relação E/A: Relação pico da onda E com pico da onda A RMSSD: Raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre os intervalos R-R normais sucessivos RyR: Receptor rianodina SERCA2: Ca<sup>2+</sup>ATPase do retículo saco(endo)plasmático SOD: Superóxido dismutase STZ: Estreptozotocina t 0: Tempo entre administração e início da ação t ação: Tempo de ação TBARS: Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico TBA: Ácido tiobarbitúrico TCA: Ácido tricloroacético t-BOOH: Hidroperóxido de tert-butil t max: Tempo máximo para o pico de ação

TNF-alfa: Fator de necrose tumoral alfa

TRAP: Capacidade antioxidante total

TRIV: Tempo de relaxamento isovolumétrico

TS: Tônus simpático

TV: Tônus vagal

UKPDS: Estudo prospectivo de diabetes do Reino Unido (do inglês, *United Kingdom Prospective Diabetes Study*)

VAR-IP: Variância do intervalo de pulso

VE: Ventrículo esquerdo

VFC: Variabilidade da frequência cardíaca

VMPicoE: Velocidade média do pico da onda E

VMPicoA: Velocidade média do pico da onda A

VPA: Variabilidade da pressão arterial

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Diabetes <i>mellitus</i> e suas complicações .....	1
1.2. Disfunções cardiovasculares no diabetes .....	1
1.3. Neuropatia Autonômica Diabética .....	3
1.4. Mecanismos envolvidos nas disfunções cardiometabólicas no diabetes.....	5
1.5. Tratamento com insulina .....	8
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>12</b>
2.1. Objetivos específicos .....	12
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
3.1. Animais .....	13
3.2. Medidas metabólicas .....	13
3.2.1. Peso corporal, indução do diabetes e glicemia .....	13
3.2.2. Reposição insulínica .....	14
3.2.3. Avaliação em gaiola metabólica .....	14
3.3. Função cardíaca .....	14
3.4. Avaliações hemodinâmicas e autonômicas .....	16
3.4.1. Cateterização .....	16
3.4.2. Registro de pressão arterial .....	16
3.4.3. Avaliação da sensibilidade dos barorreceptores .....	16
3.4.4. Controle autonômico da frequência cardíaca .....	17
3.4.5. Modulação autonômica cardiovascular .....	17
3.4. Preparação dos tecidos .....	18
3.5. Avaliações de estresse oxidativo .....	18
3.5.1. Medida de dano oxidativo.....	18
3.5.1.1. Medida de Lipoperoxidação (LPO): Quimiluminescência iniciada por t-BOOH (QL) .....	18
3.5.1.2. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	19
3.5.1.3. Dosagem de Proteínas Carboniladas (Dano a proteínas).....	19
3.5.2. Medida de antioxidantes.....	20
3.5.2.1. Catalase (CAT).....	20
3.5.2.2. Glutationa Peroxidase (GPx)	
.....	20
3.5.2.3. Capacidade Antioxidante Total (TRAP) .....	20
3.5.3. Balanço Redox	
3.5.3.1. Razão Glutationa Oxidada/Glutationa Reduzida .....	21
3.6. Análise estatística .....	21

<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1. Glicemia .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2. Massa corporal .....</b>	<b>24</b>
<b>4.3. Avaliação em gaiola metabólica .....</b>	<b>26</b>
<b>4.4. Avaliações ecocardiográficas .....</b>	<b>27</b>
4.4.1. Morfometria cardíaca .....	27
4.4.2. Função sistólica .....	28
4.4.3. Função diastólica .....	29
4.4.4. Função cardíaca global .....	30
<b>4.5. Avaliações hemodinâmicas e autonômicas .....</b>	<b>31</b>
4.5.1. Pressão arterial e frequência cardíaca .....	31
4.5.2. Avaliação da sensibilidade dos barorreceptores .....	33
4.5.3. Controle autonômico da frequência cardíaca .....	33
4.5.4. Modulação autonômica cardiovascular .....	34
<b>4.6. Avaliações de estresse oxidativo .....</b>	<b>37</b>
4.6.1. Tecido cardíaco.....	37
<b>4.6.1.1. Medidas de lipoperoxidação e oxidação de proteína.....</b>	<b>37</b>
4.6.1.2. Enzimas antioxidantes .....	38
4.6.1.3. Glutationa total, oxidada e reduzida .....	38
4.6.1.4. Capacidade antioxidante total (TRAP) .....	39
4.6.2. Tecido renal .....	39
<b>4.6.2.1. Medidas de lipoperoxidação e oxidação de proteína .....</b>	<b>39</b>
4.6.2.2. Glutationa peroxidase (GPx) .....	41
4.6.2.3. Capacidade antioxidante total (TRAP) .....	41
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>5.1. Glicemia e controle metabólico .....</b>	<b>42</b>
<b>5.2. Avaliações da morfometria e função cardíaca .....</b>	<b>48</b>
<b>5.3. Pressão arterial e frequência cardíaca .....</b>	<b>54</b>
<b>5.4. Avaliação autonômica cardiovascular .....</b>	<b>56</b>
<b>5.5. Avaliação de estresse oxidativo .....</b>	<b>60</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>
<b>8. APÊNDICES .....</b>	<b>88</b>
<b>8.1. Parecer do Comitê de Ética .....</b>	<b>88</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Diabetes *mellitus* e suas complicações**

Atualmente cerca de 347 milhões de pessoas no mundo têm diabetes *mellitus* (DM). Há projeções para o ano de 2030 que apontam um aumento alarmante da taxa mundial de incidência de DM para mais de 114% (WILD et al., 2004). Vale destacar que a prevalência da população diabética no Brasil deve alcançar cifras de 11,6 milhões até o ano de 2025 (BARRETO et al., 2007; KING et al., 1998).

Está bem estabelecido na literatura que o DM se associa com o maior risco a doenças cardiovasculares, aumentando em quatro a oito vezes a mortalidade em seus portadores quando comparados a não-diabéticos da mesma idade (DE ANGELIS; OLIVEIRA; et al., 2000; STAMLER et al., 1993). De fato, as doenças cardiovasculares são responsáveis por volta de 50 a 80% das causas de mortes de pessoas portadoras de DM. Além disto, estudos epidemiológicos mostram que 20 a 35% dos pacientes diabéticos desenvolvem insuficiência cardíaca (IC) (JAGASIA; MCNULTY, 2003). Os estudos de Framingham demonstraram que o DM dobra o risco de desenvolvimento das doenças cardiocirculatórias no homem e triplica nas mulheres. Tais achados em diabéticos estão relacionados ao aumento do risco desses apresentarem lesões coronarianas, de desenvolver IC congestiva, infartos recorrentes, arritmias e choque cardiogênico em comparação a população não-diabética (MUIR et al., 1992).

Além do dano cardiovascular, a hiperglicemia crônica, causada por ambos os tipos de DM, leva a lesões em outros tecidos devido a complicações micro e macrovasculares, que afetam os rins, os olhos e os nervos (complicações chamadas respectivamente de nefropatia, retinopatia e neuropatia diabética) (BRANDS; CLOUD, 2003). O DM em geral também é associado a dislipidemia, pois é observado nesses pacientes aumento do LDL-colesterol e redução do HDL-colesterol (MALERBI; FRANCO, 1992).

### **1.2. Disfunções cardiovasculares no diabetes**

As complicações microvasculares do diabetes ocorrem em períodos crônicos da doença, devido principalmente a ação da hiperglicemia que causa prejuízo na microcirculação. A microcirculação é composta por pequenas artérias de resistência, arteríolas, capilares e vênulas, esses vasos podem sofrer mudanças estruturais e funcionais (ROSEI, 2010). Em pacientes com diabetes tipo 1 não se é observado alterações

estruturais nas pequenas artérias de resistência, no entanto, pacientes com diabetes tipo 2 ocorre um aumento da túnica média, por hipertrofia ou hiperplasia das células musculares que compõe essa camada dos vasos, assim como uma diminuição do diâmetro do lúmen (MCNALLY PG, 1994). Nos capilares ocorre rarefação vascular e angiogênese de neovasos que são mais frágeis, nos quais acontece com mais facilidade vazamento de fluidos para o tecido, esse prejuízo nos capilares, além de disfunção endotelial na microcirculação são características observadas em ambos os tipos de diabetes (ROSEI, 2010).

Sabe-se que de fato que as alterações nos capilares intramiocárdicos são responsáveis por causar um estado conhecido como cardiomiopatia diabética. O prejuízo nos capilares também é a forma com que ocorre outras complicações crônicas do diabetes como a retinopatia, nefropatia e neuropatia (MARTINS, 2006). A dislipidemia, glicação de proteínas, aumento da agregação plaquetária são alguns dos fatores que levam a esse estado (MARTINS, 2006).

A definição de cardiomiopatia diabética foi descrita pela primeira vez por Rubler *et al.* em 1972. Foi descrita como mudanças do músculo cardíaco devido a alterações metabólicas das células miocárdicas que passam a aumentar a oxidação de ácidos graxos livres e diminuir a utilização de glicose. Esse estado pode ocorrer na ausência de angiopatia, doença valvular ou congênita. As anomalias estruturais mais comuns nos pacientes diabéticos são a hipertrofia ventricular esquerda e a disfunção diastólica e/ou sistólica (MARTINS, 2006), podendo ocorrer em pacientes com ambos os tipos de diabetes. No entanto, nos diabéticos tipo 1 de origem autoimune é comum se observar características de uma cardiomiopatia dilatada, onde ocorre aumento do tamanho da câmara ventricular e diminuição na espessura das paredes (SEFEROVIC; PAULUS, 2015).

Modelos experimentais têm sido extensivamente usados para entender melhor a relação que leva a diabéticos terem uma maior tendência a desenvolverem doenças cardiovasculares. Nossa grupo vem estudando há alguns anos os prejuízos cardíacos resultantes da administração de Estreptozotocina (STZ) em ratos. A STZ é uma droga citotóxica para as células beta pancreáticas simulando o estado de DM mais parecido com o tipo 1. Ratos diabéticos por STZ apresentam como padrão da doença hiperglicemia, hipoinsulinemia, glicosúria e perda de peso(JUNOD *et al.*, 1969; TOMLINSON *et al.*,

1992). Nesses animais ocorre redução do fluxo sanguíneo (CAMERON et al., 1991), diminuição da contratilidade cardíaca avaliação por técnica de coração isolado (DE ANGELIS; OLIVEIRA; et al., 2000), bem como alterações na morfometria cardíaca e nas funções sistólica e diastólica avaliadas pelo ecocardiograma (DE ANGELIS; OLIVEIRA; et al., 2000).

### **1.3. Neuropatia Autonômica Diabética**

Dentre as complicações crônicas do DM, existe a Neuropatia Autonômica, que é um distúrbio que afeta todas as partes do sistema nervoso autônomo (VINIK et al., 2003), se manifestando primeiramente no nervo vago (ZIEGLER, 1999). Essa alteração na atividade parassimpática leva a uma predominância da atividade simpática no balanço simpato-vagal. A alteração do sistema nervoso autônomo, com perda da homeostase entre a função simpática e parassimpática, pode ser prejudicial à saúde, sendo chamada de disfunção autonômica (DE ANGELIS et al., 2009).

A Neuropatia Autonômica é frequente entre a população diabética e está relacionada a maiores índices de mortalidade e morbidade em comparação a diabéticos sem disfunção autonômica. Estima-se que cerca de 50% dos diabéticos possuem evidências de sofrerem dessa neuropatia (KEMPLER et al., 2002; MASER et al., 2013). Essa desordem neural é de primordial importância para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares desde aterosclerose até infarto do miocárdio (DE ANGELIS et al., 2009).

Neste sentido, para se avaliar a interação do diabetes com o sistema nervoso autônomo deve-se examinar a influência da doença sobre a variabilidade da frequência cardíaca e pressão sanguínea em resposta ao bloqueio farmacológico autonômico, alterações funcionais nos baro e quimiorreflexo e alterações neuroanatômicas (DE ANGELIS et al., 2009). Em repouso a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) é alta e reduzida durante estimulação adrenérgica, enquanto a variabilidade da pressão arterial (VPA) é reduzida em repouso e aumentada durante situações estressantes (SCHAAN et al., 1997). Neste sentido, resultados publicados de nosso grupo evidenciam prejuízo na VFC e na VPA em ratos diabéticos por STZ (MOSTARDA et al., 2009).

Sabe-se também que o excesso de glicose e insulina sanguínea causam ativação simpática, levando a um estado hiperdinâmico (frequência cardíaca e débito cardíaco

aumentado), aumento da resistência periférica, da retenção de sódio e assim eventual desenvolvimento de hipertensão (ANDERSON et al., 1991; FACCHINI et al., 1996; LEMBO et al., 1992), o que pode ocorrer em períodos crônicos da doença tanto para pacientes diabéticos tipo 1 quanto tipo 2.

O consenso que se chega é que a Neuropatia Autonômica Diabética está normalmente associada com prejuízo da função parassimpática, uma predominância da função simpática e pressão arterial elevada (DE ANGELIS et al., 2009). Em ratos diabéticos por STZ as alterações referentes a disfunção autonômica passam a poder ser detectadas a partir do terceiro dia após injeção de STZ (MONCKTON; PEHOWICH, 1980; YAGIHASHI; SIMA, 1985).

Quanto a pressão arterial, neste modelo de diabetes por STZ não se observa hipertensão (CHANG; LUND, 1986; DALL'AGO et al., 1997; DE ANGELIS; OLIVEIRA; et al., 2000; HARTHMANN et al., 2007; MAEDA; FERNANDES; LULHIER; et al., 1995; MAEDA; FERNANDES; TIMM; et al., 1995; SOUZA et al., 2007; TOMLINSON et al., 1992) e é observada bradicardia de repouso (CHANG; LUND, 1986; DE ANGELIS et al., 2002; DE ANGELIS; OLIVEIRA; et al., 2000; HARTHMANN et al., 2007; MAEDA; FERNANDES; LULHIER; et al., 1995; SENGES et al., 1980; TOMLINSON et al., 1992). Adicionalmente, em modelos experimentais de diabetes por STZ foi observado redução do tônus vagal cardíaco e tônus simpático cardíaco inalterado (DE ANGELIS; OLIVEIRA; et al., 2000; MAEDA; FERNANDES; LULHIER; et al., 1995; SOUZA et al., 2007).

Vale lembrar que o sistema barorreflexo arterial é um mecanismo chave para um rápido ajuste na pressão sanguínea. Ele minimiza a variabilidade da pressão sanguínea o que é de grande importância para a homeostase fisiológica. A taquicardia mediada por barorreflexo, devido à diminuição da PA, é encontrada comprometida nos estágios iniciais da doença em modelos de diabetes por STZ (MAEDA; FERNANDES; LULHIER; et al., 1995; PAGE; WATKINS, 1978). Nas fases mais crônicas da doença observa-se redução tanto da taquicardia quanto bradicardia mediadas pelo barorreflexo (em resposta a diminuição e aumento da PA, respectivamente), mostrando disfunção nos dois lados desse sistema de controle da pressão (HARTHMANN et al., 2007; SOUZA et al., 2007; TOMLINSON et al., 1992).

A diminuição da sensibilidade barorreflexa observada no modelo de diabetes por STZ, inclusive semelhante aos dados clínicos observados em vários estudos (FRATTOLA et al., 1997; SVAČINOVÁ et al., 2002) é normalmente atribuída à neuropatia autonômica, sendo o braço aferente do barorreflexo menos estudado (DALL'AGO et al., 2002). Porém, há estudos como os do McDowell e colaboradores e de Fazan Jr. e colaboradores que mostram função normal do barorreceptor aórtico (um exemplo de estrutura da via aferente) nesse modelo de diabetes crônico (MCDOWELL; CHAPLEAU; et al., 1994; MCDOWELL; HAJDUCZOK; et al., 1994; FAZAN et al., 1997).

Foi observado inclusive, por diversos estudos nesse modelo, melhora da disfunção autonômica, assim como da sensibilidade barorreflexa, através de tratamentos não farmacológicos como treinamento físico aeróbio. Jorge e colaboradores aplicaram nesse modelo de diabetes por STZ, que apresentava hipotensão, bradicardia e prejuízo na sensibilidade barorreflexa, uma única sessão de exercício físico aeróbio e observaram normalização da pressão arterial e da frequência cardíaca. Foi observada também uma melhora da sensibilidade barorreflexa e aumento de por volta de 40% do tônus vagal comparado com os ratos diabéticos não exercitados (JORGE et al., 2011). Um trabalho do nosso grupo com ratos diabéticos por STZ submetidos ao treinamento físico uma semana após a indução do diabetes, mostrou que o treinamento físico atenuou a hipotensão e bradicardia causada pelo DM (DE ANGELIS; OLIVEIRA; et al., 2000). Além disto, evidenciamos atenuação da disfunção autonômica pós treinamento físico (HARTHMANN et al., 2007; MOSTARDA et al., 2009). Neste sentido, sendo o início do treinamento uma semana após a indução de diabetes, esses ratos já teriam desenvolvido a disfunção autonômica que começa a ser observada por volta do terceiro dia, portanto, esse resultado mostra que o exercício físico é eficiente em reverter e/ou atenuar a progressão dessa disfunção.

#### **1.4. Mecanismos envolvidos nas disfunções cardiometabólicas no diabetes**

Um número crescente de evidências sugere que a produção aumentada de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido e o radical hidroxila, participam criticamente da patogênese do diabetes, das doenças coronarianas, hipertensão, aterosclerose e síndrome metabólica (BELLÓ-KLEIN et al., 2001;

DANTAS; CARVALHO, 2000; DE ANGELIS; CESTARI; et al., 2000; PIEPER; SIEBENEICH, 1997). De fato, pacientes com hipertensão, hipercolesterolemia, DM, fumantes, e até mesmo no processo fisiológico do envelhecimento, demonstraram relação entre disfunções no endotélio vascular e aumento do **estresse oxidativo** (BERRY et al., 2001; CAI; HARRISON, 2000; DE ANGELIS; CESTARI; et al., 2000). Neste sentido, vale lembrar que quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e das defesas antioxidantes, ao ponto de deter a produção pró-oxidante, temos um quadro de estresse oxidativo (MOSTARDA et al., 2009).

O estresse oxidativo é associado ao aumento de oxidação de importantes biomoléculas como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos; isso induz a transição de permeabilidade mitocondrial provendo sinal para autofagia, apoptose e necrose (TANG; KANG; LIVESEY; et al., 2011; TANG; KANG; ZEH; et al., 2011). Porém, já foi demonstrado na literatura, que o estado de estresse oxidativo no diabetes, inicialmente causa uma readaptação das células, ativando vias de sinalização que aumentam a atividade de defesas antioxidantes para amenizar o dano oxidativo e o prejuízo de função, que ainda assim ocorrem nesses tecidos (MALFITANO; DE SOUZA JUNIOR; et al., 2014; MOSTARDA et al., 2009).

Adicionalmente, há modificação na biogênese de energia, como é evidenciado pela diminuição da respiração mitocondrial em células de coração de cobaias diabéticas por STZ. Essas mitocôndrias apresentaram redução de respiração nos complexos II e IV, assim como menor fosforilação de adenosina difosfato (ADP); elas também demonstraram maior produção de peróxido de hidrogênio quando expostas a estimulação beta-adrenérgica e alta concentração de glicose (TOCCHETTI et al., 2015).

De fato, estudos relataram que a resistência à insulina e a hiperinsulinemia aumentam a peroxidação lipídica e diminuem os antioxidantes no plasma, sugerindo que os dois estejam interligados (MIZUNO et al., 2004; XU; BADR, 1999). O aumento do estresse oxidativo foi ainda relacionado com a hiperinsulinemia e com reduzida concentração da CAT em animais (XU; BADR, 1999). As biomoléculas oxidadas são uma das formas de origem dos produtos finais de glicação avançada (PGA) (BARBOSA et al., 2008) que juntamente às EROs e às espécies reativas de nitrogênio podem levar a ativação de resposta inflamatória. Essas células inflamatórias por sua vez, tem a capacidade de aumentar o estresse oxidativo, através de aumento de produção de espécies reativas tanto

por mecanismos mitocondriais quanto não mitocondriais, como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (NOX) (LIU et al., 2014, p. 20), formando um ciclo que faz perdurar o estado inflamatório crônico de baixa intensidade observado em doenças como o diabetes (MOSTARDA et al., 2009). Também já foi relatado aumento de fator de necrose tumoral alfa (TNF alfa) e interleucina-6 (IL6) no plasma de ratos diabéticos por STZ, além de redução da expressão de genes como o Brg1 (Brahma-related gene 1) que induz a expressão de importantes enzimas antioxidantes endógenas (XU, J. et al., 2013). Essas e outras evidências têm levado muitos investigadores a sugerir que o aumento excessivo de espécies reativas de oxigênio pode ser considerado um mecanismo envolvido no desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes e doença cardiovascular.

De fato, estudos recentes sugerem que a inflamação decorrente do sistema imunológico é uma característica de doenças cardiometabólicas (KOH et al., 2005; NAKAGAWA et al., 2005). O sistema imunológico tem sido alvo de grande interesse nos últimos anos no desenvolvimento e prognóstico da doença arterial coronariana (JANSZKY et al., 2004). Além disso, o aumento dos níveis de citocinas inflamatórias como: proteína C reativa (PCR), interleucina 6 (RIDKER, PAUL M. et al., 2000)e fator de necrose tumoral (TNF alfa) (RIDKER; RIFAI;STAMPFER et al., 2000) estão associadas ao maior risco cardiovascular e ao aumento da morbidade e mortalidade entre a população em geral (PRADHAN et al., 2002; RIDKER, P. M.; HENNEKENS; et al., 2000). Um estudo experimental de Glushakova e colaboradores demonstrou alteração em marcadores inflamatórios nos rins de animais submetidos a uma dieta rica em frutose, simulando um modelo experimental de síndrome metabólica(GLUSHAKOVA et al., 2008). Também foi observado aumento da resistência à insulina acompanhado de aumento nos níveis de PCR, interleucinas 1 e 6, bem como desregulação de adipocitocinas e leptina em ratos alimentados com uma dieta rica em frutose (ARMUTCU et al., 2005). Existem dados que indicam ainda que os níveis elevados de PCR tenham sido associados ao desenvolvimento da síndrome metabólica em mulheres (PISCHON et al., 2005; QI et al., 2008).

Interessantemente, em indivíduos idosos ou com maior risco de insuficiência cardíaca crônica foram observados níveis elevados de PCR, TNF alfa e IL-6 (AGUIRRE et al., 2000; STRACK et al., 1997) associados a redução da VFC (BOSSENMAIER et al., 2000). No estudo de Janszky e colaboradores, os autores demonstraram uma forte correlação dos níveis de PCR e IL-6 com a VFC em mulheres com doença

coronariana(JANSZKY et al., 2004). Quanto ao modelo experimental de diabetes por STZ, sabe-se que os marcadores inflamatórios estão aumentados; como a IL-6 e a interleucina 1 (IL-1), enquanto a interleucina 4 (IL-4) está reduzida no plasma (WANG et al., 2013). De fato, sabe-se também que o sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático tem ação sobre a regulação da inflamação(PAVLOV et al., 2003). Atualmente o grupo do Kevin J. Tracey vem mostrando a ação da via colinérgica parassimpática sobre a resposta anti-inflamatória sistêmica de forma rápida e reflexa a estímulos inflamatórios (PAVLOV; TRACEY, 2005; TRACEY, 2007). Desta forma, o prejuízo do sistema nervoso autonômico observado em ratos e em pacientes diabéticos pode contribuir para o estado crônico inflamatório da doença.

Vale destacar que este cenário alterado pode levar a ativação de diferentes vias de sinalização e de expressão de proteínas. Foi observado aumento da expressão de receptores beta3-adrenérgicos, assim como diminuição da óxido nítrico sintase 1, que são alguns dos fatores associados a diminuição da força de contração nos corações de diabéticos (BRANDS; CLOUD, 2003). Miócitos isolados de cobaias diabéticas por STZ apresentaram aumento de contratilidade após utilização de antioxidante (palmitato) assim como normalização do balanço redox, mas sem normalização da respiração mitocondrial. Em contrapartida a infusão de insulina nestes animais restaurou somente o balanço redox, não tendo ação sobre o desempenho contrátil e sobre a respiração mitocondrial (TOCCHELLI et al., 2015).

Neste sentido, neste estudo buscamos compreender a relação entre alguns marcadores de estresse oxidativo com as disfunções metabólicas, cardiovasculares e autonômicas no modelo experimental de diabetes por STZ.

### **1.5. Tratamento com insulina**

Atualmente, a insulinoterapia, juntamente com exercício físico regular e o planejamento alimentar tem sido considerado as três principais abordagens de tratamento para pessoas com DM do tipo 1 (DE ANGELIS et al., 2006). As duas últimas abordagens são importantes também no manejo do portador de DM do tipo 2, juntamente com outras drogas, como as que aumentam a sensibilidade das células ao hormônio insulina (por exemplo, a metformina) (ARAÚJO et al., 2000). Em pacientes diabéticos tipo 2, o tratamento com insulina pode ser indicado quando o dano as células beta do pâncreas

aumentam por causa do excesso de produção de insulina para suprir a baixa sensibilidade à esse hormônio (ASTON-MOURNEY et al., 2008).

É importante destacar que o controle glicêmico, determinado pelos níveis de Hemoglobina Glicada (HbA1c), vem sendo indicado por ter uma forte relação entre a frequência de eventos cardiovasculares e mortalidade. A hiperglicemia aguda, como a pós-prandial, tem grande implicação na patogênese de complicações microvasculares. No entanto, o tratamento intensivo com hipoglicemiantes pode levar a episódios de hipoglicemia, sendo um fator limitante para o atingimento de um bom controle metabólico (MILECH et al., 2001).

A fim de evitar situações de hiperglicemia e hipoglicemia diárias, tendo assim um maior controle glicêmico, vários análogos da insulina foram obtidos através de modificações bioquímicas; foram alteradas suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, mantendo, no entanto, sua afinidade aos receptores celulares. Vários artigos da literatura descrevem as principais alterações estruturais introduzidas para obtenção de diferentes análogos insulínicos (BELL, 2007; DESMANGLES, 2008; GÓMEZ-PÉREZ; RULL, 2005; MORALES, 2007; STECK et al., 2007). A insulina protamina neutra de Hagedorn (NPH) é uma dissolução da insulina regular em excesso de protamina. É considerada de ação intermediária sendo seu tempo de ação no organismo (t ação) de 12 a 15 horas (GÓMEZ-PÉREZ; RULL, 2005; STECK et al., 2007). Diferentemente das insulinas de longa duração, possui um pico de ação (t max) de 180 a 480 minutos. Já o tempo que decorre entre a administração e o início da ação (t 0) é de 60 a 120 minutos (STECK et al., 2007).

A importância de um bom controle glicêmico é evidenciada por diversos estudos clínicos que indicam a relação entre a manifestação das complicações crônicas do diabetes com os níveis glicêmicos e duração da doença (UKPDS *Group*, 1998; DCCT *Research Group*, 1993; PIRART, 1984). Já foi descrito na literatura o aparecimento precoce de anomalias em nervos autonômicos e periféricos, mostrando um desenvolvimento prematuro dessas complicações (PFEIFER et al., 1984; YOUNG et al., 1983), ou seja, logo que o controle metabólico é prejudicado. Também já foi mostrado que as abnормidades no sistema nervoso autônomo podem ser revertidas quando se obtém um melhor controle metabólico (FERREIRA et al., 1998; HREIDARSSON, 1981).

No modelo experimental de diabetes induzida por STZ, Schaan e colaboradores desenvolveram um trabalho com administração de NPH (1U) uma vez ao dia, a partir de 48 horas após a indução do diabetes. Foi observado que com o melhor controle metabólico obtido pode evitar que os ratos diabéticos por STZ desenvolvessem uma modulação autonômica alterada, disfunção observada no grupo de ratos diabéticos sem tratamento; mostrando, portanto, que o tratamento com insulina poderia atenuar a disfunção autonômica que esse modelo desenvolve(SCHAAN et al., 1997).

Um trabalho publicado em 2013 aplicou um tratamento com insulina NPH (2U pela manhã e 4U à tarde) em ratos Wistar atingindo após seis dias de tratamento uma normalização da glicemia, do peso corporal e da glicosúria. Tais achados indicam que esse regime de tratamento é uma boa forma de se restabelecer o controle metabólico nesse modelo experimental. Nesse mesmo trabalho também foi evidenciado efeitos benéficos da reposição insulínica sobre disfunções renais e hepáticas (DAVID-SILVA et al., 2013).

Recentemente, uma revisão publicada no banco de dados da Cochrane por Fullerton e colaboradores comparou 12 ensaios clínicos com pacientes diabéticos tipo 1 sob controle convencional e rígido da glicemia e pode constatar que o tratamento intensivo levou a diminuição do desenvolvimento de complicações crônicas do diabetes, no entanto, com relação a progressão das complicações em indivíduos que já haviam as desenvolvido, não houve diferença significativa para nenhuma das complicações (nefropatia e retinopatia, não havendo evidências suficientes para neuropatia) quando comparado controle convencional vs. controle rígido da glicemia. Em contrapartida, o tratamento intensivo com insulina levou a um aumento de casos de hipoglicemia severa, se mostrando mais sujeito a esse risco pacientes que começaram o tratamento com valores baixos de HbA1c. O tratamento intensivo com insulina também levou a aumento significativo do peso corporal em relação ao tratamento convencional (FULLERTON et al., 2014).

Vale destacar que o modelo de diabetes experimental mais utilizado no mundo é o de indução por STZ. Tal modelo normalmente é utilizado sem a reposição de insulina, o que induz níveis glicêmicos extremamente elevados, normalmente entre 300-500 mg/dL. Ao longo dos últimos anos que temos trabalhado e publicado com este modelo, foi-nos questionado muitas vezes como seriam os efeitos estudados se fosse realizada a reposição de insulina, como ocorre em humanos. Desta forma, buscamos neste estudo validar o

regime de reposição de insulina neste modelo para que em futuros estudos possamos avaliar os efeitos de diferentes abordagens, como o treinamento físico no risco cardiometabólico remanescente observado em pacientes diabéticos mesmo sob tratamento farmacológico. Vale ainda destacar, que buscamos avaliar se mesmo após a normalização dos níveis glicêmicos são observadas alterações autonômicas e no estresse oxidativo que possam justificar a maior mortalidade nesta população mesmo sob bom controle glicêmico pela reposição de insulina.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o efeito da terapia de reposição insulínica nas alterações metabólicas, cardiovasculares, renais e autonômicas observadas no diabetes experimental por estreptozotocina.

### **2.1. Objetivos específicos**

Avaliar em ratos diabéticos por STZ, tratados ou não com insulina por 30 dias, parâmetros:

- ✓ metabólicos: peso corporal, glicemia, volume urinário e peso de fezes;
- ✓ de morfometria e função cardíaca;
- ✓ hemodinâmicos: pressão arterial e frequência cardíaca;
- ✓ autonômicos: tônus do simpático e do parassimpático cardíaco, sensibilidade dos barorreceptores, modulação autonômica cardiovascular (VFC e VPA);
- ✓ de estresse oxidativo no ventrículo esquerdo (VE) e rins: lipoperoxidação, balanço redox pela razão glutationa oxidada/reduzida, proteínas carboniladas, catalase, glutationa peroxidase, superóxido dismutase e capacidade antioxidante total.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Ratos Wistar machos (230-260g) foram obtidos a partir do biotério Central da Universidade Nove de Julho. Receberam ração padrão laboratorial e água *ad libitum*, e ficarão alojados em gaiolas contendo de 4 a 5 animais/cada a 22-24°C com ciclo dia/noite de 12h. Os procedimentos e protocolos seguiram as orientações de Ética em Cuidados de Animais Experimentais aprovados pelo *Institutional Animal Care and Use Committee*. Este projeto foi aprovado pelo CEUA da UNINOVE com o parecer número An0011/2014.

Todos os grupos foram acompanhados por 30 dias (n=8/cada)

**Grupo C:** controle

**Grupo D:** diabético

**Grupo DTI:** diabético tratado com insulina

#### **3.2. Medidas metabólicas**

##### **3.2.1. Peso corporal, indução do diabetes e glicemia**

O peso corporal foi avaliado semanalmente. Após jejum de quatro horas o diabetes foi induzido por uma única injeção de estreptozotocina (STZ, 50mg/kg; *Sigma Chemical Co, EUA*) na veia caudal, dissolvida em tampão citrato (0,01M, pH 4,5)(RERUP, 1970). Os animais controles foram injetados somente tampão citrato.

A glicemia foi mensurada por hemoglicoteste com o uso de tiras reagentes (*Advantage Roche*) para confirmar a glicemia no início do protocolo, bem como semanalmente, sendo que estas medidas foram realizadas sempre no período da tarde (*Accu-Check Instant test, Boehringer Mannheim*). A mensuração ocorreu sem jejum, devido ao risco de hipoglicemia dos animais tratados com insulina. Foram selecionados para os grupos diabéticos os animais que apresentaram glicemia acima de 250 mg/dL dois dias após a administração de STZ, sendo os demais desconsiderados.

##### **3.2.2. Reposição insulínica**

Os ratos do grupo DTI receberam doses diárias de insulina protamina neutra

Hagedorn, por via subcutânea, 2U durante a manhã e 4U no período da tarde(DAVIDSILVA et al., 2013). O tratamento começou 2 dias após a injeção de STZ, logo após a medida da glicemia para diagnóstico de hiperglicemia e seguiu até final das avaliações (30 dias de tratamento).

### **3.2.3. Avaliação em gaiola metabólica**

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas e a urina de vinte e quatro horas foi recolhida em 15 e 30 dias após a indução do diabetes. Foi permitido o acesso livre a comida e água durante o período de recolha. A polifagia, polidipsia e poliúria forma avaliadas.

### **3.3. Função cardíaca**

As avaliações ecocardiográficas foram realizadas aos 30 dias de protocolo experimental em todos os grupos estudados. As análises foram realizadas por um único observador e às cegas quanto à identidade dos grupos experimentais. Em cada exame, foi coletado um total de cinco medidas para cada variável, sendo calculados posteriormente, a média, e o erro padrão da média dessas medidas, de acordo com as orientações da “*American Society of Echocardiography*” (SAHN et al., 1978). Os ratos foram anestesiados (80mg/kg ketamina e 12mg/kg de xilazina intraperitoneal), a região torácica foi devidamente tricotomizada e mantidos em decúbito dorsal para realização do exame no aparelho Sequóia 512 (*ACUSON Corporation, Mountain View, CA*). As imagens foram obtidas com um transdutor linear e multifrequencial (10-14 mHz), que permite imagens bidimensionais e monodimensionais simultâneas, além de fluxo por efeito Doppler espectral. Foram realizados os registros eletrocardiográficos mediante a colocação de três eletrodos para a derivação DII. Para registro das imagens foi utilizado gel de transmissão para ultrassom de viscosidade médio-alta (*General Imaging Gel, ATL. Reedsille, EUA*).

Os índices de função sistólica como a fração de encurtamento foram calculados pelo modo M, de acordo com as orientações da “*American Society of Echocardiography*” (Sahn, et al., 1978) e do “*Chamber Quantification Writing Group*”, desenvolvido em conjunto com a Associação Europeia de Ecocardiografia, da Sociedade Européia de Cardiologia. A partir da visualização do ventrículo esquerdo (corte transversal) ao nível dos músculos papilares foi realizado: diâmetro diastólico (dDiaVE) e sistólico (sDVE) do ventrículo esquerdo e a espessura do septo interventricular (SIV) e da parede posterior do

ventrículo esquerdo em sístole e diástole (PPVESis e PPVEDia). Após a realização das medidas foi calculada a massa do ventrículo esquerdo (MVE) segundo orientação da Sociedade Americana de Ecocardiografia, que estima a massa do ventrículo esquerdo através da utilização da seguinte fórmula matemática: MVE =

$[(dDiaVE+SIV+PPVEDia)^3 - (dDiaVE)^3] \times 1,047$ , onde 1,047 ( $\text{mg/mm}^3$ ) corresponde a densidade do miocárdio. Além da massa do ventrículo esquerdo, foi calculada a força de encurtamento do ventrículo esquerdo ( $D\% = [(dDiaVE - sDiaVE)/dDiaVE] \times 100$ ). Os valores absolutos da massa do ventrículo esquerdo foram normalizados usando a seguinte fórmula ajustada por Devereux e colaboradores, assumindo que o VE possui geometria esférica:  $MVE = 0.8 (1.04 ([LVEDD + PWD + IVSd]^3 - [LVEDD]^3)) + 0,6$  g (DEVEREUX; REICHEK, 1977; FOPPA et al., 2005).

A função diastólica foi analisada utilizando-se os índices derivados da curva de velocidade de fluxo diastólico mitral e do fluxo sistólico da via de saída do VE, obtidos pela técnica de Doppler pulsátil. A curva de velocidade diastólica foi obtida a partir da imagem apical das quatro câmaras posicionando-se o volume-amostra próximo à face ventricular da valva mitral. Foram determinadas: a) onda E – maior valor da velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular (enchimento rápido do ventrículo); b) tempo de desaceleração da onda E (ms), entre o pico da onda E e o ponto em que a rampa de desaceleração intercepta a linha de base da curva de velocidade do fluxo diastólico mitral. A curva de velocidade dos fluxos para análise do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) foi obtida posicionando-se o volume-amostra numa posição intermediária entre a valva mitral e a via de saída do VE. Foi determinado o TRIV/ms, entre o final do fluxo sistólico na via de saída do VE e o início do fluxo diastólico mitral.

Função cardíaca global foi avaliada usando o Índice de Performance Miocárdica (IPM), que é a razão entre o tempo total gasto em atividade isovolumétrica (tempo de contração isovolumétrica e tempo de relaxamento isovolumétrico) pelo tempo de ejeção. Estes intervalos de tempo Doppler foram medidos a partir do intervalo de fluxo mitral e do fluxo de saída do VE. O intervalo "a", a partir da interrupção até o início do fluxo mitral, é igual à soma do tempo de contração isovolumétrica, o tempo de ejeção e o tempo de relaxamento isovolumétrico. Tempo de ejeção, representado por "b", é derivado da duração do perfil de velocidade Doppler da saída do fluxo do VE. A fórmula usada para o cálculo do IPM é  $(a-b)/b$  (WICHI et al., 2007).

### **3.4. Avaliações hemodinâmicas e autonômicas**

#### **3.4.1. Cateterização**

No dia seguinte da avaliação ecocardiográfica (30<sup>o</sup> dia), os animais foram anestesiados com ketamina ( $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) e xilazina ( $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) para colocação de cânulas de polietileno (PE-10, com diâmetro interno de 0,01 mm conectadas a uma peça de PE50, com diâmetro interno de 0,05 mm). As cânulas foram preenchidas com soro fisiológico e posicionadas no interior da artéria carótida e veia jugular para registro da PA, frequência cardíaca e administração de salina e drogas vasoativas, respectivamente, as medidas foram realizadas 24 horas após a cirurgia com o animal acordado. A extremidade a ser conectada ao transdutor de pressão foi fechada com pinos de aço inoxidável. As extremidades das cânulas de menor calibre (PE-10) foram introduzidas na luz dos vasos. As cânulas foram fixadas com fio de algodão, na artéria e na veia e suas extremidades mais calibrosas foram passadas subcutaneamente, exteriorizadas no dorso da região cervical, fixadas com fio de algodão na pele. Após o término da cirurgia os animais foram tratados com uma única injeção de penicilina (*Benzetacil*, *Fontoura Wyeth*, 60.000U).

#### **3.4.2. Registro de pressão arterial**

Pelo menos 24 horas após a cirurgia de canulação, os registros de pressão arterial pulsátil forneceram valores diretos da pressão arterial em todos os grupos experimentais. A cânula arterial foi conectada a um tubo de polietileno (PE 50) e este a um transdutor eletromagnético (*Kent Instruments*) que, por sua vez, foi conectado a um amplificador (*General Purpose Amplifier-Stemtech, Inc.*). O sinal analógico da pressão arterial foi convertido para digital (*Stemtech, Inc.*), registrado em tempo real em microcomputador com sistema Windaq, com frequência de amostragem de 2000Hz por canal.

#### **3.4.3. Avaliação da sensibilidade dos barorreceptores**

Após o registro da PA e da FC, uma extensão de aproximadamente 20 cm (PE10) foi conectada na cânula venosa para posterior injeção de drogas vasoativas. Após os animais terem permanecido em condições de repouso por 15 minutos, a sensibilidade dos barorreceptores foi testada através da infusão de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio. Fenilefrina e nitroprussiato de sódio foram infundidas randomicamente entre os animais, iniciando-se a sessão com um ou outro fármaco. Foram utilizadas doses crescentes,

iniciando a fenilefrina com 0,25 até 32 µg/mL e o nitroprussiato de sódio com 2,5 até 100 µg/mL.

Para análise da sensibilidade dos barorreceptores, o pico máximo ou mínimo da PAM foi comparado aos valores de PAM do período controle. Da mesma forma, a variação máxima da FC foi comparada com os valores de FC do período controle, imediatamente antes da injeção das drogas, para posterior quantificação das respostas. A sensibilidade barorreflexa foi avaliada pelo índice calculado através divisão da variação da FC pela variação da PAM.

#### **3.4.4. Controle autonômico da frequência cardíaca**

Após a avaliação da sensibilidade dos barorreceptores e com o retorno da FC e da PA a valores próximos dos obtidos no registro basal, foi realizada a injeção de atropina (3 mg/kg) e após 5 minutos da injeção, a PA foi registrada por 5 minutos. Ainda sob efeito da atropina, foi realizada a injeção de propranolol (4 mg/kg) e após 5 minutos da injeção, a FC foi registrada por 5 minutos. Com o duplo bloqueio farmacológico, atropina e propranolol atinge-se a FC intrínseca. No dia seguinte, repetiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente invertendo-se a sequência das injeções dos fármacos (bloqueio invertido). O tônus simpático foi calculado através da subtração da máxima FC alcançada após bloqueio do parassimpático com atropina menos a FC intrínseca, observada após o duplo bloqueio (atropina + propranolol). Já o tônus simpático foi calculado através da subtração da mínima FC atingida após o bloqueio simpático com propranolol, menos FC intrínseca, observada após o duplo bloqueio (atropina + propranolol).

#### **3.4.5. Modulação autonômica cardiovascular**

A partir do registro basal dos animais acordados, foi possível utilizar a ferramenta de análise tempo-frequência da variabilidade da PAS. Os parâmetros para análise no domínio do tempo consistiram em calcular os valores médios da PAS, sendo a sua variabilidade quantificada pela variância da PAS.

A análise no domínio da frequência consiste da decomposição do sistograma pela Transformada Rápida de Fourier (FFT). Após esse remodelamento matemático, foram obtidas as potências absolutas da banda de baixa frequência (BF: 0,20-0,75 Hz)(BRANDS; CLOUD, 2003).

A variabilidade do intervalo de pulso foi obtida pela análise do tacograma a partir do registro da PAS, no qual a frequência dos batimentos foi determinada pelo intervalo entre dois picos sistólicos. Para essa análise foram utilizados registros estáveis, de no mínimo 5 minutos e com frequência de amostragem de 2.000 Hz. Também dois componentes foram obtidos na análise espectral: muito baixa frequência (MBF: banda de muito baixa frequência), baixa frequência (BF: 0,20-0,75 Hz) e alta frequência (AF: 0,753,0 Hz). O componente BF foi usado como um índice da atividade simpática. O componente AF foi usado como um índice da atividade parassimpática. Além disso, avaliou também as variáveis % BF (banda de baixa frequência do intervalo de pulso), %AF (banda de alta frequência do intervalo de pulso), RMSSD (raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre os intervalos R-R normais sucessivos) e VAR-IP (variância do intervalo de pulso) (ISHISE et al., 1998).

### **3.4. Preparação dos tecidos**

Após as avaliações hemodinâmicas, os animais foram sacrificados por decapitação, os corações e os rins foram coletados e guardados em freezer -80°C para posterior análise bioquímica. Os cadáveres foram colocados em sacos específicos para lixo biológico e mantidos em refrigerador para posteriormente serem incinerados pela empresa responsável.

### **3.5. Avaliações de estresse oxidativo**

#### **3.5.1. Medida de dano oxidativo**

##### **3.5.1.1. Medida de Lipoperoxidação (LPO): Quimiluminescência iniciada por t-BOOH (QL)**

O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (o hidroperóxido de tert-butil – t-BOOH) ao homogeneizado de tecido, avaliando-se a capacidade de resposta produzida pela amostra. A quimiluminescência foi medida em um contador beta (*TriCrab 2800TR, PerkinElmer*) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de tritio. As determinações foram realizadas em câmara escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consiste em 3,5 mL de uma solução tampão de fosfatos 20 mmol/L, contendo KCl 140 mmol/L (pH 7,4), à

qual foi adicionado 0,5 mL de homogeneizado. Após esse momento, foi realizada uma leitura inicial, considerada como a emissão basal de luz pelo homogeneizado. O hidroperóxido de tert-butila foi usado na concentração de 400 mmol/L, dos quais foram adicionados 30  $\mu$ L no meio de reação para obter-se uma concentração final de 3mmol/L. Foi medida a emissão de luz e desta foi descontada a emissão basal do homogeneizado para fins de cálculo (GONZALEZ FLECHA et al., 1991).

### **3.5.1.2. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)**

Para que ocorra a reação, adiciona-se, a 0,25mL de homogeneizado, 0,75mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%(P/V), que tem a função de desnaturar as proteínas presentes e acidificar o meio de reação. Essa mistura foi então agitada e centrifugada durante 3 minutos a 1000g. Foi retirado 0,5mL do sobrenadante e a este foi adicionado 0,5mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (P/V), que reagiu com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e em seguida foi resfriada no gelo. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 535nm em espectrofotômetro (Biospectro) (BUEGE; AUST, 1978).

### **3.5.1.3. Dosagem de Proteínas Oxidadadas (Carbonilas)**

O ensaio para detecção das carbonilas é uma das técnicas utilizadas para a determinação de proteínas modificadas oxidativamente (REZNICK; PACKER, 1994). A técnica se baseia na reação das proteínas oxidadas do plasma sanguíneo com 2,4 dinitrofenil hidrazina (DNPH) em meio ácido, seguido de sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos e incubação final com guanidina. Desta forma, a absorbância das carbonilas foi medida em um espectrofotômetro a 360nm, num meio de reação contendo os seguintes reagentes: guanidina (6M) em ácido clorídrico (HCl) (2,5M) pH= 2,5; 2,4 DNPH em HCl (2,5M); ácido tricloroacético (TCA) 20%; TCA 10%; etanol - acetato de etila 1:1 (V/V). Paralelamente foi realizada a curva padrão de proteína, com albumina, com a absorbância lida em 280nm no espectrofotômetro.

## **3.5.2. Medida de antioxidantes**

### **3.5.2.1. Catalase**

A taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade da CAT. Desta forma, o consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser utilizado como uma medida

de atividade da enzima CAT. O ensaio consiste em medir a diminuição da absorbância a 240nm, comprimento de onda onde há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio, utilizando-se cubetas de quartzo. Para a realização das medidas foi usada uma solução tampão constituída de fosfatos a 50 mmol/L em pH 7,4. Foram adicionados 9 $\mu$ L deste tampão e 10 $\mu$ L de amostra de tecido na cubeta do espectrofotômetro, sendo esta mistura descontada contra um branco de tampão fosfato. A seguir foram adicionados 35 $\mu$ L de peróxido de hidrogênio (0,3 mol/L) e foi monitorada a diminuição da absorbância no espectrofotômetro (BOVERIS; CHANCE, 1973).

### **3.5.2.2. Glutationa Peroxidase (GPx)**

Como a GPx catalisa a reação de hidroperóxidos com glutationa reduzida (GSH) para formar glutationa oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido, a atividade da enzima pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx. A atividade da GPx foi medida em um espectrofotômetro, sendo monitorada a diminuição de absorbância do NADPH a 340 nm. Na cubeta do espectrofotômetro, foram adicionados 540 $\mu$ L de tampão, 50  $\mu$ L do homogeneizado (amostra), 300  $\mu$ L de NADPH, 50  $\mu$ L de GSH e 10  $\mu$ L de GR. Foi registrada a absorbância por um período de aproximadamente 2 minutos, para obtenção da linha de base. Após esse momento, foram adicionados 50  $\mu$ L de hidroperóxido de tertbutila, e a diminuição da absorbância devida ao consumo de NADPH foi monitorada por mais 3 minutos (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984).

### **3.5.2.3. Capacidade Antioxidante Total (TRAP)**

Esta técnica é baseada na decomposição do 2,2' Azo-bis (2-amidino-propano) diidrocloreto (ABAP) que gera radicais livres. Os radicais formados pela decomposição do Azo vão, por sua vez, reagir com o luminol acrescentado ao meio de reação, gerando outro radical livre mais energético e com maior emissão de luz, que é detectado por contador beta (*TriCrab 2800TR, PerkinElmer*) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio em sala escura. Porém, se no meio de reação existir a presença de uma substância antioxidante, esta irá neutralizar os radicais livres e, assim, diminuir a emissão de luz. Quando toda a substância antioxidante tiver reagido, ou seja, quanto todo antioxidante tiver sido consumido, o luminol volta a reagir com o ABAP radical aumentando novamente a emissão de luz detectada pelo contador. A primeira

leitura foi realizada com Azo (2,0 ml) e luminol (10 µL) nesta, verificamos a formação de radicais livres, posteriormente realizamos uma curva padrão utilizando o Trolox (5 µL e 10 µL) como antioxidante e, medimos a capacidade antioxidante de nossas amostras observando-se o tempo que a amostra inibiu a formação dos radicais do luminol (LISSI et al., 1995).

### **3.5.3. Balanço Redox**

#### **3.5.3.1. Razão Glutationa Oxidada/Glutationa Reduzida**

Glutationa Total - A glutationa total mede a reação de óxido redução entre GSH e GSSG. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consiste em uma solução de tampão fosfato 300 mM ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ ), e uma solução de DTNB (ácido ditionitrobenzóico). No momento do ensaio, foi agregado 1 mL de tampão fosfato, 100mL de DTNB, zerado o espectro (Biospectro) e adicionado 250 mL amostra (BEUTLER et al., 1963).

Glutationa Oxidada – Adicionou-se ácido perclórico a amostra, centrifugou-se, em seguida neutralizou-se com bicarbonato potásico ( $\text{CO}_3\text{HK}$ ). Retirou-se uma alíquota de 60mL + 60 mL DNTB + 60 mL GSSH e 60 mL NADPH. A leitura foi realizada em espectrofotômetro 414 nm. Uma vez neutralizada com  $\text{CO}_3\text{HK}$  foi adicionado 5 ml de 2 vinil piridina e deixou-se repousar por uma hora a temperatura ambiente. Logo se repetiu o processo anterior. A diferença entre a primeira e a segunda leitura é a GSSG (TIETZE, 1969).

### **3.6. Análise estatística**

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média. O teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para identificar variáveis paramétricas ou não-paramétricas. Foi utilizado a ANOVA de uma via seguida pelo post-hoc de Student Newmann Keuls para verificar diferença entre os três grupos. O ANOVA de medidas repetidas foi utilizado para a comparação entre os grupos em tempos diferentes. Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significantes.

## 4. RESULTADOS

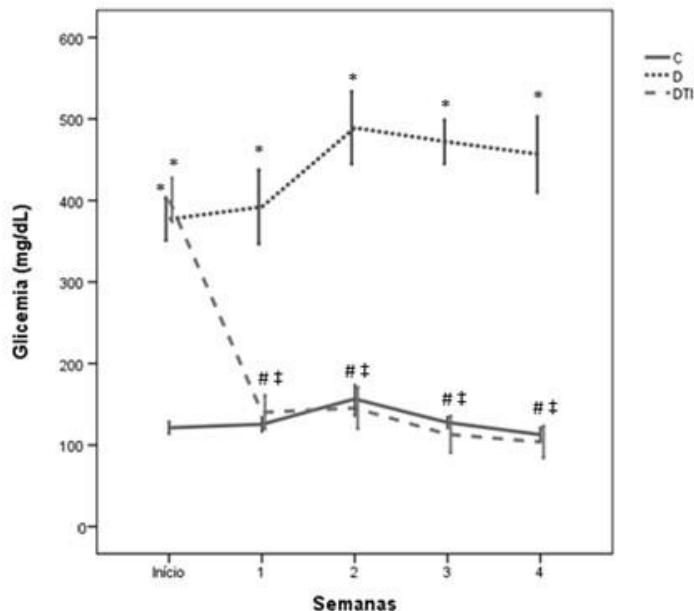
### 4.1. Glicemia

No início do protocolo os grupos diabéticos apresentaram hiperglicemia ( $>250\text{mg/dL}$ ) (Tabela 1). Porém, enquanto o grupo D permaneceu com a glicemia elevada durante os 30 dias, o tratamento com insulina induziu uma normalização desse parâmetro no grupo DTI ao longo das semanas (Tabela 1, Figura 1).

**Tabela 1** - Glicemia dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) no início e durante as 4 semanas de protocolo.

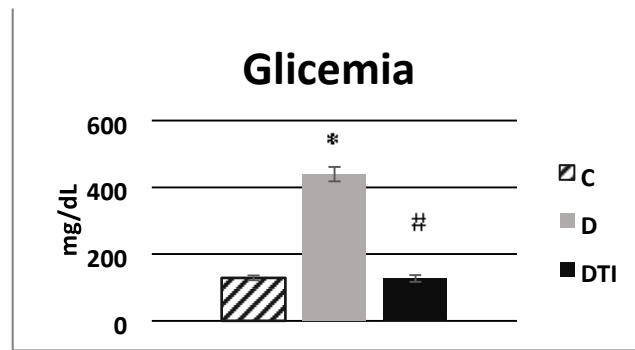
Glicemia (mg/dL)	C	D	DTI
<b>Início</b>	$121 \pm 6,9$	$370 \pm 21,4 *$	$392 \pm 22,8 *$
<b>Primeira semana</b>	$125 \pm 8,3$	$411 \pm 45,5 *$	$153 \pm 16,6 # \ddagger$
<b>Segunda semana</b>	$156 \pm 17,8$	$488 \pm 33,1 *$	$135 \pm 19,9 # \ddagger$
<b>Terceira semana</b>	$127 \pm 5,3$	$471 \pm 25,8 *$	$113 \pm 18,3 # \ddagger$
<b>Quarta semana</b>	$112 \pm 8,1$	$456 \pm 44,6 *$	$103 \pm 15,9 # \ddagger$

Dados representados por média  $\pm$  erro padrão da média. \* $P<0,05$  vs. C, # $P<0,05$  vs. D e  $\ddagger P<0,05$  vs. inicial do mesmo grupo.



**Figura 1.** Glicemia dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) no início e ao longo do protocolo. \* $P<0,05$  vs. C, # $P<0,05$  vs. D e  $\ddagger P<0,05$  vs. inicial do mesmo grupo.

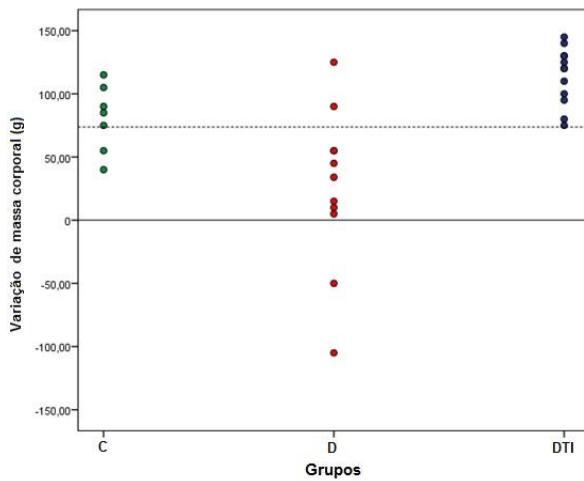
A média da glicemia durante as 4 semanas de tratamento com insulina foi menor no grupo DTI em comparação ao grupo D (C:  $128,59 \pm 7,41$ ; D:  $439,75 \pm 21,55$  e DTI:  $126,62 \pm 10,10$  mg/dL) (Figura 2).



**Figura 2.** Glicemia durante as 4 semanas de protocolo dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) ao longo dos 30 dias de protocolo. \* $P<0,05$  vs. C e # $P<0,05$  vs. D.

#### 4.2. Massa corporal

A Figura 3 mostra a distribuição do ganho de massa corporal, por animal, nos três grupos. A linha tracejada representa a média de variação de massa corporal de todos os animais (73,8 g). Observa-se o aumento acima da média de todos do grupo DTI. Além disto, dois animais do grupo D tiveram redução do peso inicial ao longo dos 30 dias (redução de 50 e 150 g).



**Figura 3.** Variação da massa corporal em gramas depois de 30 dias de protocolo, por animal, nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI). Linha tracejada representa a média de ganho de massa corporal de todos os animais (73,8 g).

A Tabela 2 e a Figura 4 ilustram o ganho de massa corpórea semanalmente dos três grupos ao longo do protocolo.

O grupo C não apresentou diferença significante entre a massa corporal inicial e a da primeira semana. Na segunda semana, já se observou um aumento em relação ao início, mas não em relação à primeira semana. Na terceira semana, a massa corporal foi maior do que a inicial, do que a da primeira semana e do que a da semana anterior (vs. segunda semana). Já na quarta e última semana de protocolo, se repetiu o padrão de aumento com exceção em relação à semana anterior (vs. terceira semana) (Tabela 2, Figura 4).

O mesmo não ocorreu com o grupo DTI que desde a primeira semana de protocolo já apresentou um aumento significativo de massa corporal em relação ao início. A cada semana esse grupo apresentou aumentos significativos da massa corporal em relação às semanas anteriores (Tabela 2, Figura 4).

A massa corporal do grupo D se mostrou igual durante todo protocolo, não havendo diferença significativa com o passar das semanas (Tabela 2, Figura 4).

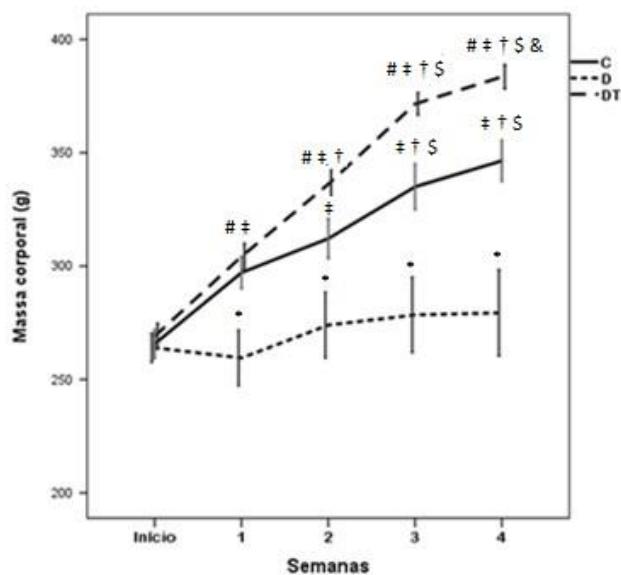
**Tabela 2** – Massa corporal dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) no início e nas semanas de protocolo.

Massa Corporal (g)	C	D	DTI
<b>Início</b>	265 ± 6,0	264 ± 6,3	268 ± 4,8
<b>Primeira semana</b>	297 ± 6,4	259 ± 12,3 *	304 ± 5,8 # ‡
<b>Segunda semana</b>	312 ± 7,1 ‡	274 ± 14,5 *	336 ± 6,2 # ‡ †
<b>Terceira semana</b>	335 ± 10,1 ‡ † \$	278 ± 16,6 *	371 ± 4,6 # ‡ † \$
<b>Quarta semana</b>	346 ± 10,1 ‡ † \$	279 ± 18,9 *	383 ± 5,3 # ‡ † \$ &
<b>Ganho de massa</b>	80,7 ± 10,0	15,4 ± 17,9 *	115,0 ± 6,0 #

Dados representados por média ± erro padrão da média. \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D e ‡P<0,05 vs. inicial do mesmo grupo; †P<0,05 vs. primeira semana, \$P<0,05 vs. segunda semana e &P<0,05 vs. terceira semana.

Em relação a massa corporal no início do protocolo, não houve diferença entre os grupos. Na comparação entre os grupos, o grupo D apresentou massa corporal menor já na primeira semana em comparação ao grupo C e DTI no mesmo tempo. Essa diferença foi observada na segunda, terceira e quarta semanas de protocolo (Tabela 2, Figura 4). O mesmo padrão foi observado quanto a variação de massa corporal (ganho de massa) após

os 30 dias de protocolo, que evidenciou reduzido quanto a massa corporal no grupo D em relação aos grupos C e DTI (Tabela 2).



**Figura 4.** Massa corporal ao longo das 4 semanas de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI). \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D, ‡P<0,05 vs. inicial do mesmo grupo, †P<0,05 vs. primeira semana, \$P<0,05 vs. segunda semana e &P<0,05 vs. terceira semana.

#### 4.3. Avaliação em gaiola metabólica

O grupo D apresentou maior consumo de água, volume urinário, consumo alimentar e peso de fezes em relação ao grupo C. Os parâmetros avaliados na gaiola metabólica, que se encontravam alterados no grupo D em comparação ao C, foram normalizados no grupo DTI, tanto no 15º quanto no 30º dia de protocolo não havendo diferença em um mesmo grupo entre os tempos (Tabela 3).

**Tabela 3** – Parâmetros avaliados na gaiola metabólica nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) em 15 e 30 dias de protocolo.

	Água consumida (mL)		Consumo de ração (g)		Volume urinário (mL)		Peso de fezes (g)	
	15 dias	30 dias	15 dias	30 dias	15 dias	30 dias	15 dias	30 dias
C	32,8 ± 4,6	30,0 ± 2,2	24,9 ± 1,8	24,0 ± 0,5	5,0 ± 0,7	6,2 ± 1,2	6,5 ± 0,6	7,5 ± 0,6
D	120,0 ± 12,8*	126,0 ± 13,7 *	42,0 ± 1,9*	42,5 ± 2,7 *	81,4 ± 10,4 *	85,2 ± 9,7 *	15,4 ± 2,2 *	18,3 ± 3,8 *

<b>DTI</b>	<b>41,1 ± 2,0 #</b>	<b>36,9 ±2,0 #</b>	<b>29,0 ± 0,9 #</b>	<b>25,9 ± 1,4 #</b>	<b>14,5 ± 1,6 #</b>	<b>16,1 ± 1,6 #</b>	<b>8,2 ± 0,8 #</b>	<b>7,7 ± 0,8 #</b>
------------	---------------------	--------------------	---------------------	---------------------	---------------------	---------------------	--------------------	--------------------

Dados representados por média ± erro padrão da média. \*P<0,05 vs. C; #P<0,05 vs. D.

#### 4.4. Avaliações ecocardiográficas

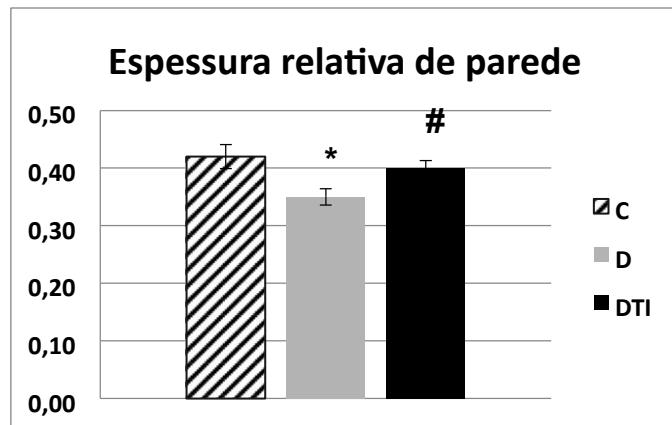
##### 4.4.1. Morfometria cardíaca

O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo não foi diferente entre os grupos na medida absoluta, porém quando corrigido pelo peso corporal se mostrou diminuído no grupo D em comparação ao grupo C e normalizado no grupo DTI (Tabela 4). Houve também redução da espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole (PPVEDia) (Tabela 4) e da espessura relativa de parede (ERP C: 0,40±0,013 e DTI: 0,38±0,014 vs. D: 0,30±0,018) (Figura 5) no grupo D em relação ao grupo C, as quais foram revertidas com o tratamento com insulina

**Tabela 4** – Morfometria cardíaca após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI).

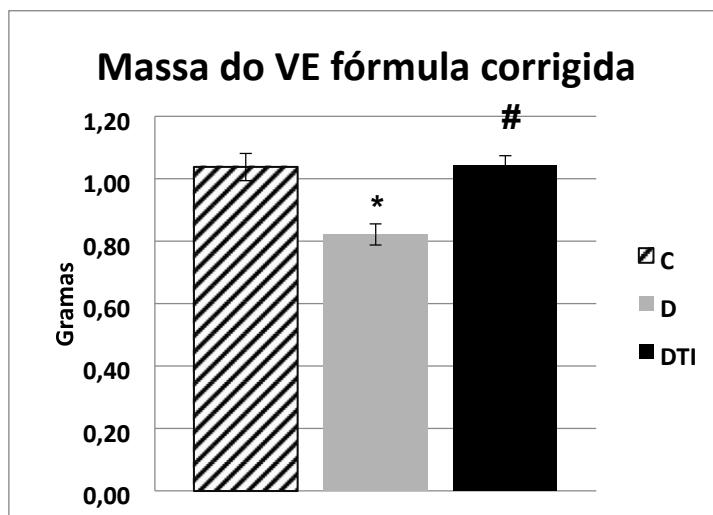
<b>Avaliações ecocardiográficas</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>DTI</b>
<b>dDiaVE (cm)</b>	0,610±0,035	0,638±0,41	0,679±0,033
<b>dDiaVE corrigido (cm/g)</b>	0,00173±0,00009	0,00241±0,00019*	0,00175±0,00008#
<b>PPVEDia (cm)</b>	0,119±0,0026	0,096±0,0069*	0,124±0,0040#
<b>PPVEDia corrigido (cm/g)</b>	0,00033±0,000034	0,00038±0,000035	0,00031±0,000012

Dados representados como média ± erro padrão da média. Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole (PPVEDia), espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole corrigido, diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (dDiaVE) e diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo corrigido. \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D.



**Figura 5.** Espessura relativa de parede nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. \*P<0,05 vs. C e #<0,05 vs. D.

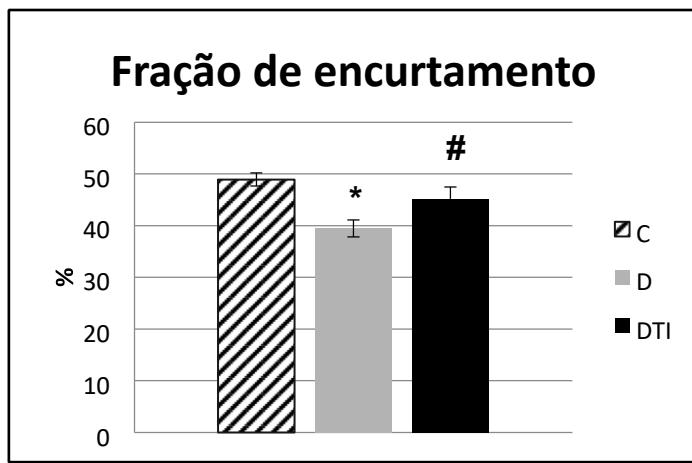
Na Figura 6 está representada a massa do ventrículo esquerdo (MVE) em gramas calculada através da fórmula para MVE corrigida, a qual estava reduzida no grupo D em relação ao grupo C e foi normalizada no grupo DTI (C:  $1,04\pm0,04$  e DTI:  $1,04\pm0,03$  vs. D:  $0,82\pm0,03$  g).



**Figura 6.** Massa do ventrículo esquerdo fórmula corrigida em gramas dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. \*P<0,05 vs. C e #<0,05 vs. D.

#### 4.4.2. Função sistólica

Não foi observada diferença na fração de ejeção entre os grupos (Fração de ejeção; C:  $81,62\pm2,10$ ; D:  $84,78\pm2,31$  e DTI:  $79,03\pm2,81$  %), porém observou-se redução da fração de encurtamento no grupo D em comparação ao grupo C, a qual foi normalizada no grupo DTI (Fração de encurtamento; C:  $47,88\pm1,82$ ; D:  $41,02\pm1,31$  e DTI:  $46,82\pm1,99$  %) (Figura 7).



**Figura 7.** Fração de encurtamento nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. \*P<0,05 vs. C e #P<0,05 vs. D.

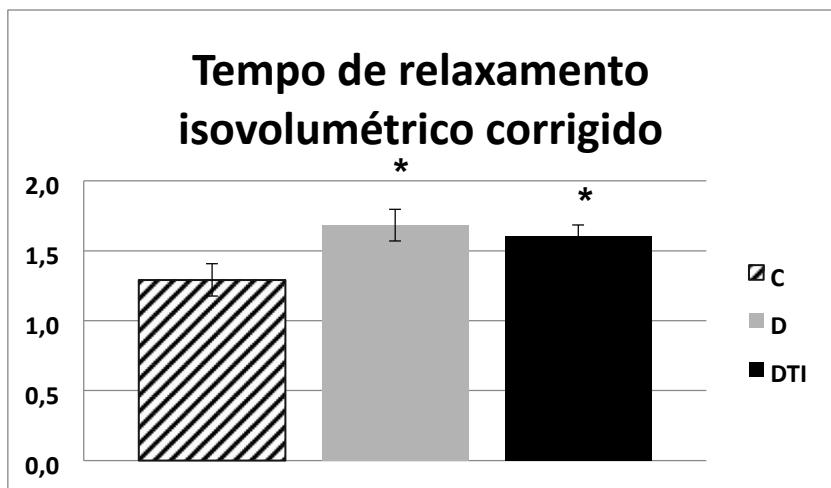
#### 4.4.3. Função diastólica

O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) não foi diferente entre os grupos em valor absoluto (Tabela 5). No entanto, o TRIV corrigido pelo intervalo R-R apresentou um aumento no grupo D e no grupo DTI em relação aos ratos do grupo C (Figura 8) (TRIV corrigido, D:  $1,68 \pm 0,11$  e DTI:  $1,60 \pm 0,08$  vs. C:  $1,29 \pm 0,11$ ). Similarmente houve redução da relação do pico da onda E com pico da onda A (relação E/A) no grupo de ratos diabéticos em relação ao grupo controle, a qual o tratamento com insulina também não foi capaz de reverter (Tabela 5).

**Tabela 5** – Funções sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo avaliadas pelo ecocardiograma após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI).

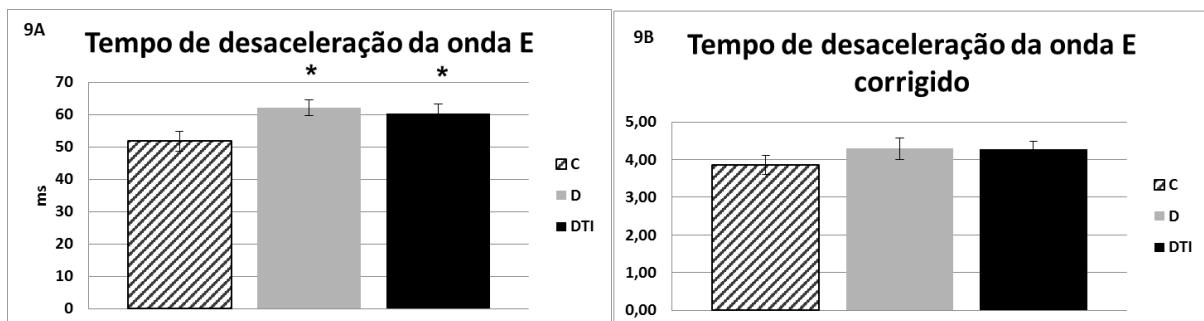
Avaliações ecocardiográficas	C	D	DTI
<b>TRIV (ms)</b>	$20,00 \pm 2,50$	$22,85 \pm 2,00$	$21,66 \pm 1,80$
<b>Relação E/A</b>	$2,45 \pm 0,38$	$1,53 \pm 0,10^*$	$1,69 \pm 0,17^*$
<b>VMPicoE (m/s)</b>	$0,787 \pm 0,041$	$0,705 \pm 0,044$	$0,761 \pm 0,030$
<b>VMPicoA (m/s)</b>	$0,359 \pm 0,045$	$0,477 \pm 0,049$	$0,474 \pm 0,038$

Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), velocidade média do pico da onda E (VMPicoE), velocidade média do pico da onda A (VMPicoA), relação pico da onda E com pico da onda A (relação E/A). \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D.



**Figura 8.** Tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pelo intervalo R-R nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. \* $P<0,05$  vs. C.

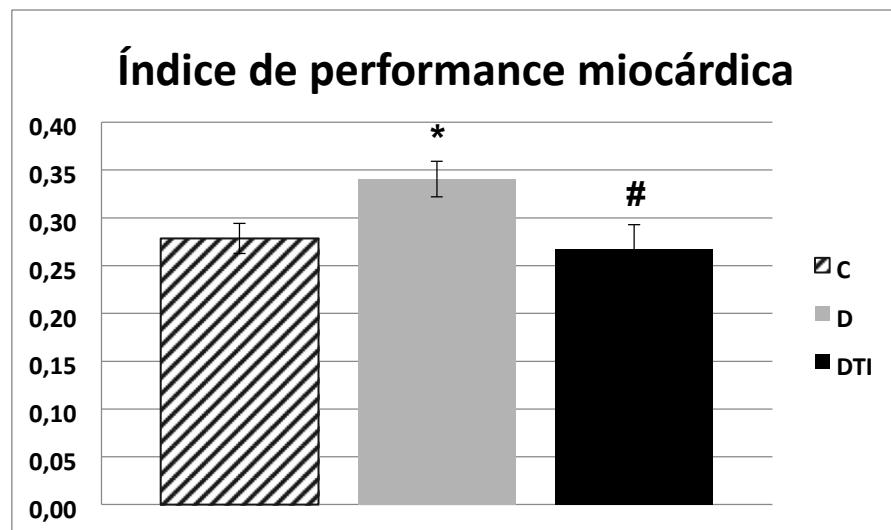
O tempo de desaceleração da onda E em valores absolutos se apresentou aumentado nos grupos D e DTI em relação ao grupo C (Figura 9A). No entanto, no valor do tempo de desaceleração da onda E corrigido pelo intervalo R-R não foi encontrada diferença entre os grupos (Figura 9B) (Valores absolutos; C:  $51,75\pm3,14$ , D:  $62,16\pm2,44$  e DTI:  $60,33\pm2,87$ ms. Valores corrigidos; C:  $3,86\pm0,25$ , D:  $4,29\pm0,28$  e DTI:  $4,27\pm0,22$ ms/bpm).



**Figura 9.** Tempo de desaceleração da onda E nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. Figura 9A: valores absolutos. Figura 9B: valores corrigidos pelo intervalo R-R. \* $P<0,05$  vs. C.

#### 4.4.4. Função cardíaca global

A função cardíaca global foi avaliada pelo índice de performance miocárdica (IPM), esse parâmetro se mostrou aumentado no grupo D ( $0,34\pm0,018$ ) em comparação ao grupo C ( $0,28\pm0,015$ ), atingindo uma normalização com o tratamento insulínico no grupo DTI ( $0,27\pm0,025$ ) (Figura 10).



**Figura 10.** Índice de performance miocárdica nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. \*P<0,05 vs. C e #P<0,05 vs. D.

#### 4.5. Avaliações hemodinâmicas e autonômicas

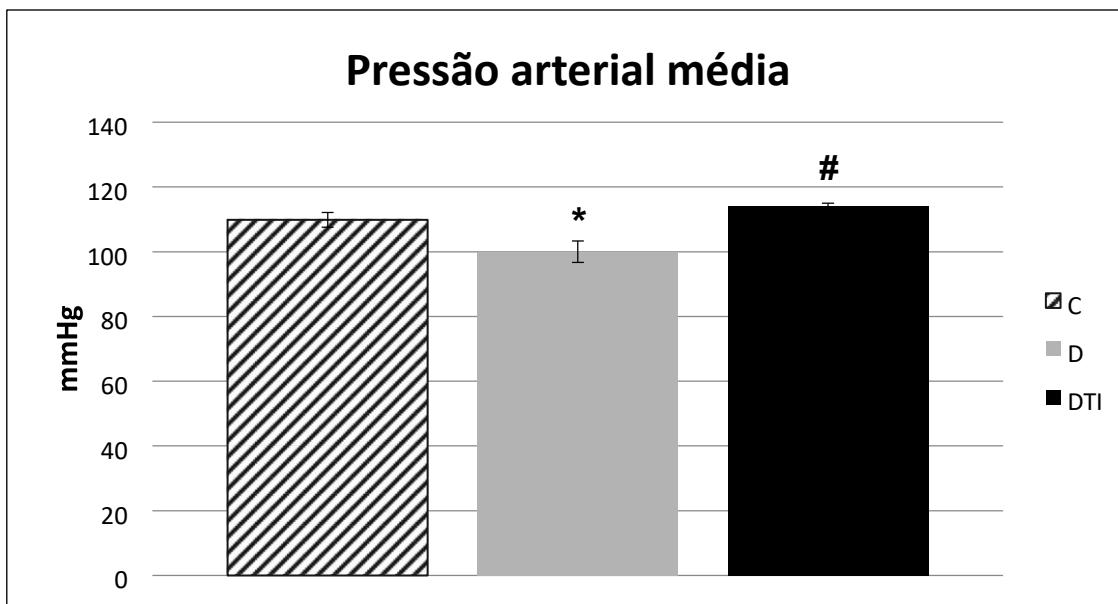
##### 4.5.1. Pressão arterial e frequência cardíaca

O grupo D apresentou redução da pressão arterial sistólica e pressão arterial média (PAM) em relação ao grupo C. O tratamento insulínico normalizou a PAM (DTI: 114±0,97 e C: 109±2,27 vs. D: 100±3,33 mmHg), assim como a PA sistólica e diastólica (Tabela 6).

**Tabela 6** – Pressão arterial sistólica e diastólica após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI).

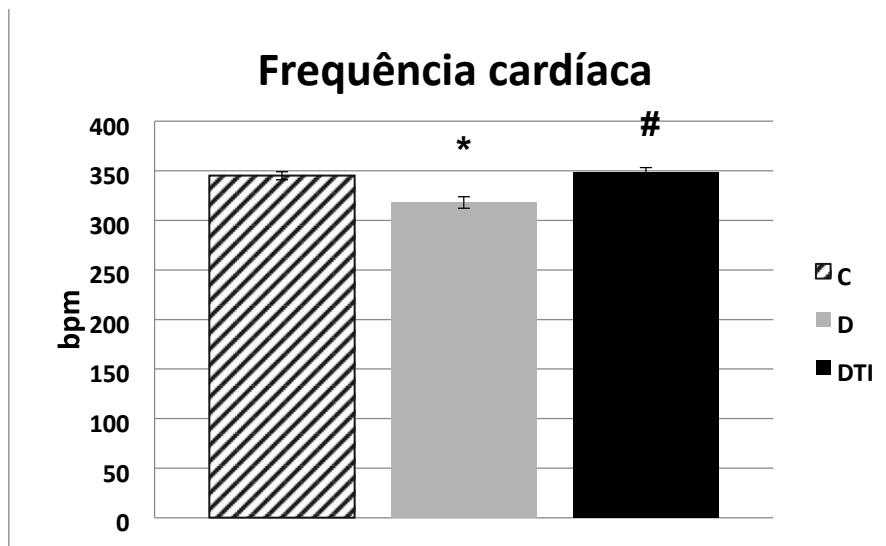
Pressão arterial(PA)	C	D	DTI
PA sistólica (mmHg)	122±2,80	109±3,37*	125±1,51#
PA diastólica (mmHg)	94±2,20	87±3,48	99±0,75#

Dados representados como média ± erro padrão da média. Pressão arterial sistólica (PA sistólica) e pressão arterial diastólica (PA diastólica). \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D.



**Figura 11.** Pressão arterial (PA) nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. Figura 8A: PA sistólica. Figura 8B: PA diastólica. Figura 8C: PA média. \* $P<0,05$  vs. C, # $P<0,05$  vs. D.

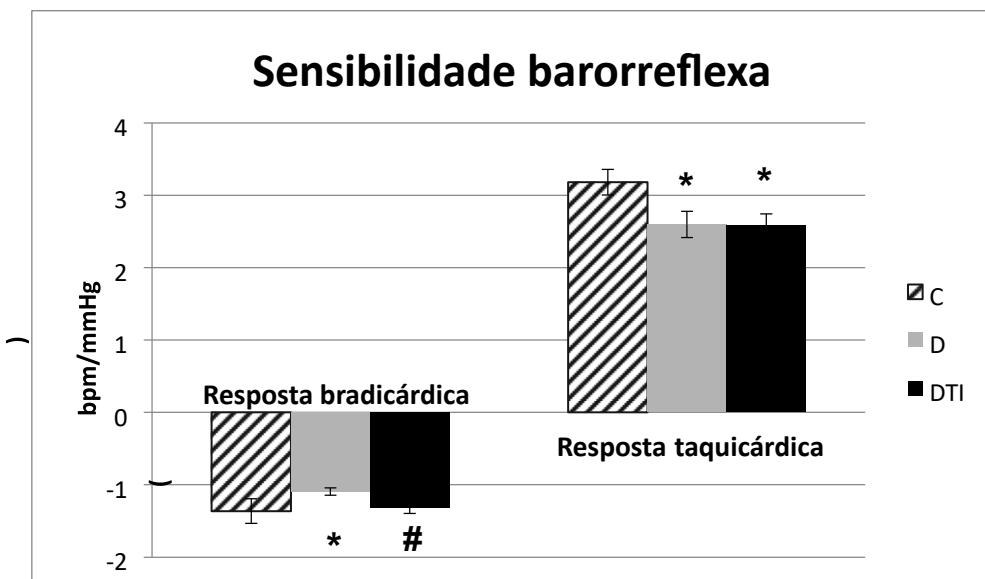
O grupo D apresentou redução da FC basal em relação ao grupo C e o grupo DTI obteve uma normalização desse parâmetro (DTI:  $348\pm4,5$  e C:  $345\pm4,0$  vs. D:  $318\pm5,8$  bpm) (Figura 9).



**Figura 12.** Frequência cardíaca (FC) no repouso dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. \* $P<0,05$  vs. C, # $P<0,05$  vs. D.

#### 4.5.2. Avaliação da sensibilidade dos barorreceptores

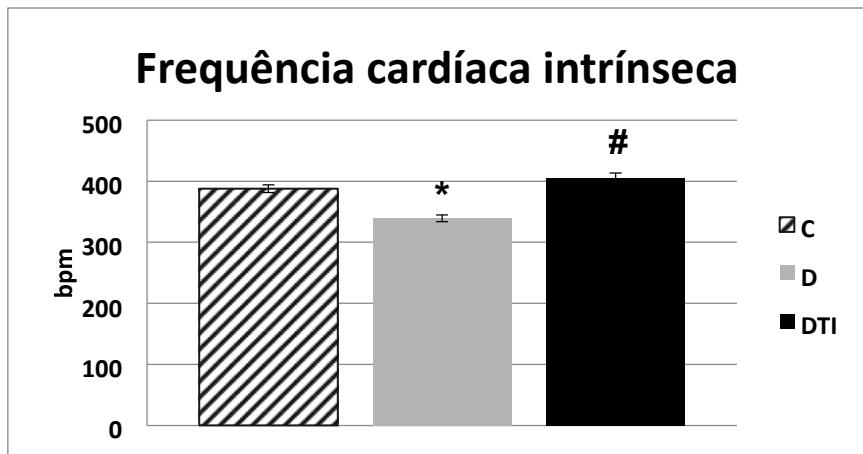
A sensibilidade dos barorreceptores, avaliada pela resposta bradicárdica se mostrou prejudicada no grupo D quando comparada ao grupo C e o tratamento com insulina foi eficiente em reverter essa disfunção (C:  $-1,36 \pm 0,11$  e DTI:  $-1,32 \pm 0,07$  vs. D:  $-1,06 \pm 0,05$  bpm/mmHg). No entanto, a resposta taquicárdica se apresentou diminuída no grupo diabético, permanecendo diminuída mesmo com o tratamento com insulina no grupo DTI (C:  $3,18 \pm 0,17$  vs. D:  $2,59 \pm 0,18$  e DTI:  $2,58 \pm 0,15$  bpm/mmHg) (Figura 13).



**Figura 13.** Sensibilidade dos barorreceptores, avaliada pelas respostas bradicárdicas e taquicárdicas, nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. \* $P<0,05$  vs. C, # $P<0,05$  vs. D.

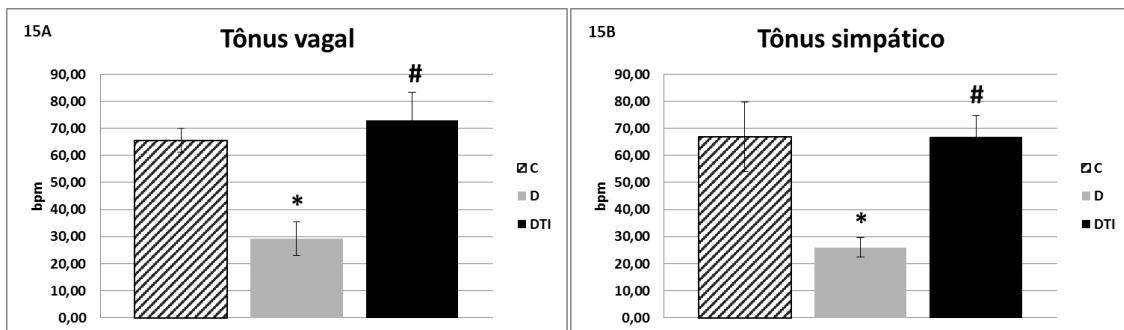
#### 4.5.3. Controle autonômico da frequência cardíaca

A frequência cardíaca intrínseca se mostrou diminuída no grupo D ( $339 \pm 5,6$  bpm) em relação ao grupo C ( $388 \pm 6,5$  bpm) e o tratamento com insulina conseguiu normalizá-la (DTI:  $405 \pm 8,8$  bpm).



**Figura 14.** Frequência cardíaca intrínseca nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D.

No grupo diabético as avaliações do tônus vagal (TV) (Figura 15A) e tônus simpático (TS) (Figura 15B) sobre o coração se apresentaram reduzidas nesse grupo em comparação aos demais, sendo normalizadas no grupo de ratos diabéticos tratados com insulina (TV; D: 29,3±6,2 vs. C: 65,6±4,5 e TS; D: 26,0±3,7 vs. C: 66,8±12,8 e DTI: 66,9±7,9bpm).



**Figura 15.** Controle autonômico nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. Figura 15A: Tonus vagal. Figura 15B: Tonus simpático.

#### 4.5.4. Modulação autonômica cardiovascular

Na Tabela 7 são mostrados os parâmetros de avaliação da variabilidade da frequência cardíaca tanto no domínio do tempo quanto no domínio da frequência.

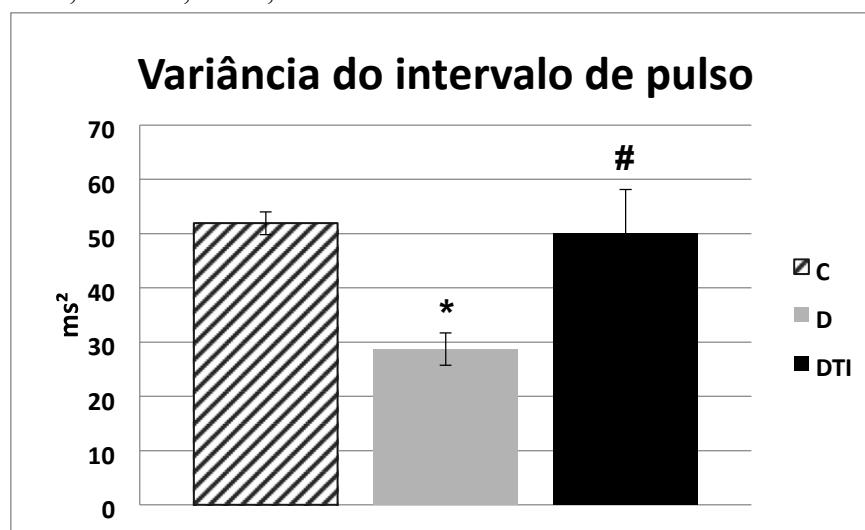
O desvio padrão do intervalo de pulso estava reduzido no grupo D em relação ao grupo C, sendo normalizado no grupo DTI. A raiz quadrada da média do quadrado das

diferenças entre os intervalos R-R normais adjacentes (RMSSD), a banda de baixa frequência (BF) do intervalo de pulso e a banda de alta frequência (AF) do intervalo de pulso não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Na análise do domínio da frequência, pode-se observar também redução da variância do intervalo de pulso no grupo D, disfunção restabelecida pelo tratamento com insulina no grupo DTI (D:  $28,7 \pm 2,99$  vs. C:  $51,9 \pm 2,10$  e DTI:  $50,06 \pm 8,07 \text{ ms}^2$ ) (Figura 16).

**Tabela 7** – Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e no domínio da frequência após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI).

	C	D	DTI
<b>DOMÍNIO DO TEMPO</b>			
DP (ms)	$7,20 \pm 0,15$	$5,24 \pm 0,27^*$	$7,49 \pm 0,58\#$
RMSSD (ms)	$5,82 \pm 0,39$	$7,02 \pm 0,19$	$6,67 \pm 0,38$
<b>DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA</b>			
BF ( $\text{ms}^2$ )	$2,46 \pm 0,82$	$1,13 \pm 0,19$	$3,21 \pm 0,67$
AF ( $\text{ms}^2$ )	$7,53 \pm 1,48$	$10,53 \pm 0,85$	$10,07 \pm 0,54$

Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Domínio do tempo: desvio padrão do intervalo de pulso (DP) e raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre os intervalos RR normais adjacentes (RMSSD). Domínio da frequência: banda de baixa frequência (BF) do intervalo de pulso e banda de alta frequência (AF) do intervalo de pulso. \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D.



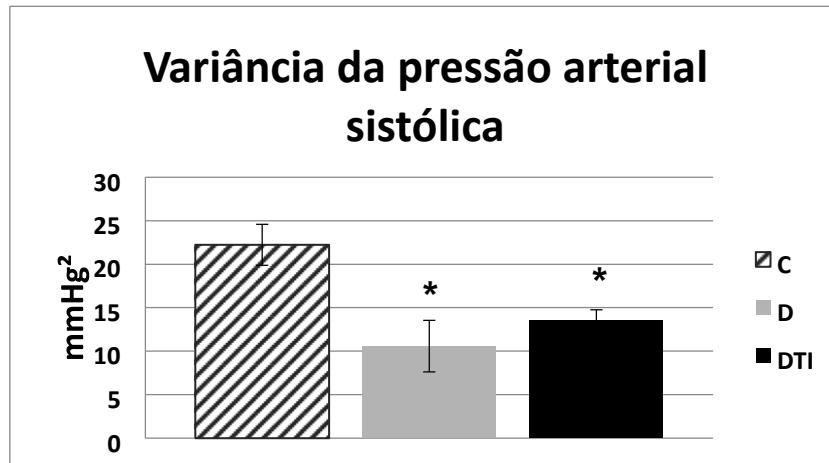
**Figura 16.** Variância do intervalo de pulso nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D.

Na avaliação dos parâmetros de variabilidade da pressão arterial sistólica, o grupo D teve uma diminuição significativa do desvio padrão da pressão arterial sistólica em relação ao grupo C, o que não foi observado no grupo DTI (Tabela 8). Na análise do domínio da frequência, pode-se observar também redução da variância da pressão arterial sistólica nos ratos do grupo diabético, disfunção não revertida com o tratamento com insulina no grupo DTI (C:  $22,23 \pm 2,37$  vs. D:  $10,58 \pm 2,97$  e DTI:  $13,53 \pm 1,21 \text{ mmHg}^2$ ) (Figura 17). Não foi observado diferença entre os grupos na BF da PAS (Tabela 8).

**Tabela 8** – Variabilidade da pressão arterial sistólica no domínio do tempo e no domínio da frequência após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI).

	C	D	DTI
<b>DOMÍNIO DO TEMPO</b>			
DP (mmHg)	$4,71 \pm 0,32$	$3,03 \pm 0,45^*$	$3,50 \pm 0,48$
<b>DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA</b>			
BF (mmHg $^2$ )	$1,79 \pm 0,22$	$2,44 \pm 0,93$	$2,67 \pm 0,41$

Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Domínio do tempo: desvio padrão da pressão arterial sistólica (DP). Domínio da frequência: banda de baixa frequência (BF) da pressão arterial sistólica. \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D.



**Figura 17.** Variância da pressão arterial sistólica nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D.

## 4.6. Avaliações de estresse oxidativo

### 4.6.1. Tecido cardíaco

#### 4.6.1.1. Medidas de lipoperoxidação e oxidação de proteína

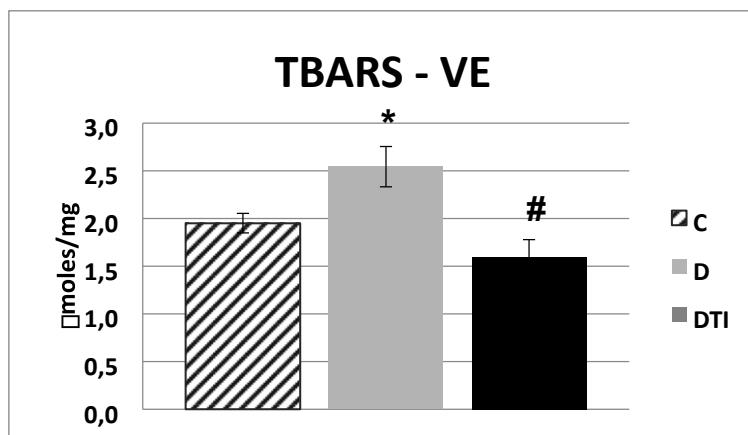
Foi observada diminuição de lipoperoxidação por QL no grupo DTI quando comparado com os dois outros grupos (grupo C e D) (Tabela 9).

**Tabela 9** – Medida de lipoperoxidação por quimiluminescência (QL), por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e oxidação de proteínas por carbonilas no ventrículo esquerdo após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI).

	C	D	DTI
<b>QL</b> (cps/mg proteína)	4921±366	5095±284	3593±219 *#
<b>TBARS</b> ( $\mu$ moles/mg proteína)	1,95±0,10	2,54±0,21 *	1,59±0,18 #
<b>Carbonilas</b> (nmol/mg proteína)	2,25±0,34	2,23±0,02	2,75±0,22

Dados representados como média  $\pm$  erro padrão da média. \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D.

Já a lipoperoxidação medida pela técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico se mostrou aumentada no grupo diabético, sendo o tratamento com insulina eficiente em reverter esse aumento (Tabela 9, Figura 17).



**Figura 18.** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no ventrículo esquerdo (VE) nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D.

A dosagem de proteínas oxidadas (carbonilas) não foi diferente entre os grupos no ventrículo esquerdo (Tabela 9).

#### 4.6.1.2. Enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutationa peroxidase estavam aumentadas no grupo diabético e o tratamento com insulina normalizou a atividade dessas enzimas (Tabela 10).

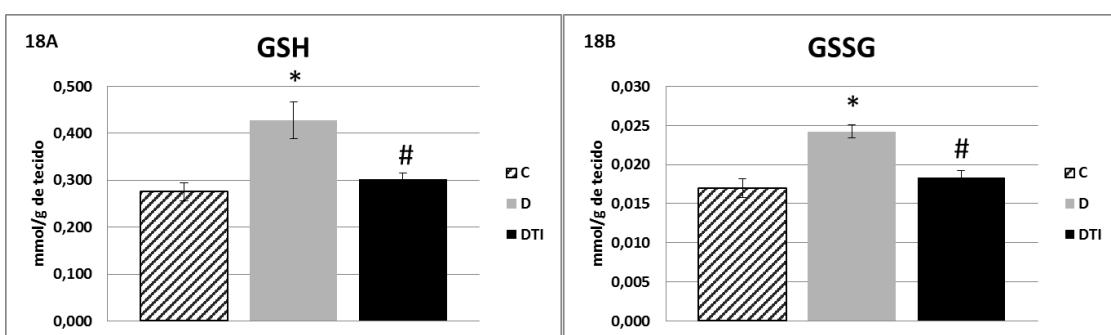
**Tabela 10** – Atividade de enzimas antioxidantes no ventrículo esquerdo após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI).

	C	D	DTI
<b>CAT(nmol/mg proteína)</b>	0,81±0,05	1,32±0,08*	0,79±0,05#
<b>GPx (nmol/min/mg proteína)</b>	0,048±0,011	0,081±0,007*	0,048±0,004#

Dados representados como média ± erro padrão da média. Catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx). \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D.

#### 4.6.1.3. Glutationa total, oxidada e reduzida

A glutationa total (GSH total) no ventrículo esquerdo estava aumentada no grupo D em relação aos demais (GSH total; D: 0,452±0,040 vs. C: 0,293±0,019 e DTI: 0,320±0,014 mmol/g tecido). O grupo diabético mostrou aumento da glutationa reduzida (GSH) (Figura 18A), assim como também teve aumento da glutationa oxidada (GSSG) (Figura 18B) em relação aos outros grupos C e DTI (GSH; D: 0,428±0,039 vs. C: 0,275±0,019 e DTI: 0,302±0,013 mmol/g tecido. GSSG; D: 0,0242±0,0008 vs. C: 0,0169±0,0012 e DTI: 0,0183±0,0009 mmol/g tecido).

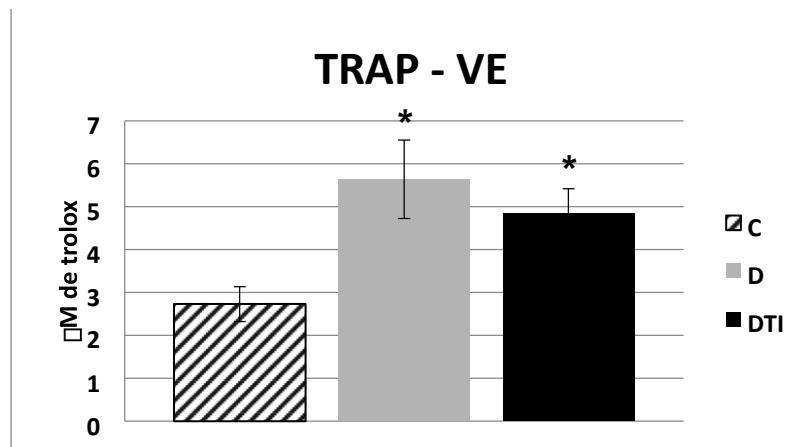


**Figura 189.** Glutationa reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) no ventrículo esquerdo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D.

No entanto, a razão entre a glutatona reduzida pela glutatona oxidada foi semelhante entre os grupos estudados (GSH/GSSG; C:  $16,55\pm0,94$ , D:  $16,46\pm0,78$  e DTI:  $16,51\pm0,63$ ).

#### 4.6.1.4. Capacidade antioxidante total (TRAP)

Houve um aumento da capacidade antioxidante total nos grupos D e DTI em comparação ao grupo C (D:  $5,64\pm0,91$  e DTI:  $4,84\pm0,58$  vs. C:  $2,73\pm0,41 \mu\text{M}$  de trolox).



**Figura 20.** Capacidade antioxidante total (TRAP) no ventrículo esquerdo (VE) nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. \*P<0,05 vs. C.

#### 4.6.2. Tecido renal

##### 4.6.2.1. Medidas de lipoperoxidação e oxidação de proteína

No tecido renal foi observado aumento da lipoperoxidação por QL no grupo D em comparação ao grupo C e esse aumento foi revertido no grupo DTI (Tabela 11).

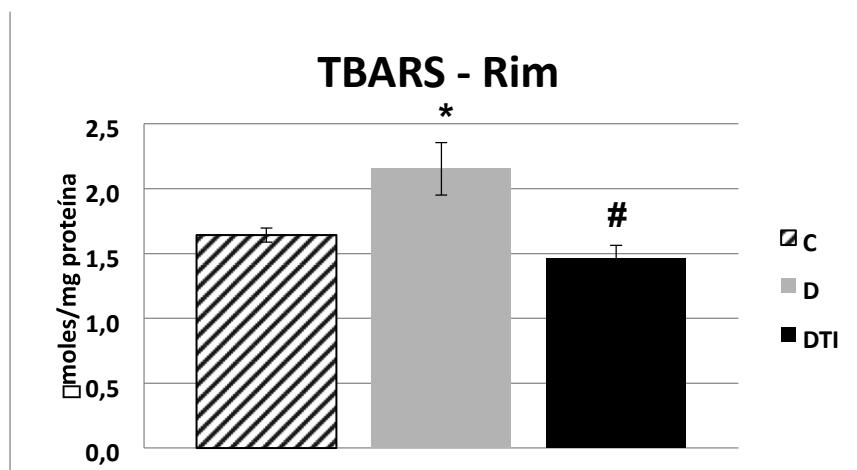
**Tabela 11** – Medida de lipoperoxidação por quimiluminescência (QL), por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e oxidação de proteínas por carbonilas em tecido renal após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI).

	C	D	DTI
QL (cps/mg proteína)	$2411\pm337$	$3686\pm309^*$	$2750\pm218^\#$

<b>TBARS</b> (nmoles/mg proteína)	1,64±0,05	2,15±0,20 *	1,46±0,10 #
<b>Carbonilas</b> (nmol/mg proteína)	2,93±0,06	3,28±0,08*	3,05±0,03#

Dados representados como média ± erro padrão da média. \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D.

A lipoperoxidação também se mostrou aumentada pela técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no grupo D em relação ao grupo C, sendo também restabelecida aos valores similares aos do grupo C no grupo DTI (Tabela 11, Figura 19).



**Figura 191.** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tecido renal nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo. \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D.

A dosagem de proteínas oxidadas (carbonilas) em tecido renal estava aumentada no grupo de ratos diabéticos em comparação ao grupo de ratos controle. O tratamento insulínico foi capaz de reverter esse aumento de dano a proteínas no grupo de ratos diabéticos tratados com insulina (Tabela 11).

#### 4.6.2.2. Glutationa peroxidase (GPx)

A atividade da GPx em tecido renal se apresentou aumentada no grupo D em comparação ao grupo C, no entanto, o tratamento com insulina no grupo DTI foi capaz de normalizar esse parâmetro (Tabela 12).

**Tabela 12** – Atividade da glutationa peroxidase (GPx) em tecido renal após 30 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI).

	C	D	DTI

---

<b>GPx (nmol/min/mg proteína)</b>	0,093±0,008	0,147±0,005*	0,110±0,004#
-----------------------------------	-------------	--------------	--------------

Dados representados como média ± erro padrão da média. \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D.

#### 4.6.2.3. Capacidade antioxidante total (TRAP)

Não houve diferença significativa na capacidade antioxidante total entre os grupos estudados após 30 dias de protocolo em tecido renal (Tabela 13).

**Tabela 13** – Capacidade antioxidante total (TRAP) em tecido renal nos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (DTI) após 30 dias de protocolo.

	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>DTI</b>
<b>TRAP (µM de trolox)</b>	56,55±7,04	61,93±6,28	48,43±5,32

Dados representados como média ± erro padrão da média. \*P<0,05 vs. C, #P<0,05 vs. D.

## 5. DISCUSSÃO

Considerando que se observa maior mortalidade em portadores de diabetes mellitus tipo 1 mesmo sob bom controle glicêmico, neste estudo objetivamos avaliar o efeito da terapia de reposição insulínica nas alterações metabólicas, cardiovasculares, renais e autonômicas observadas no diabetes experimental por estreptozotocina. Nossos resultados evidenciaram melhora do controle metabólico associado à normalização da morfometria, função sistólica e autonômica cardíaca, bem como atenuação de indicadores de estresse oxidativo em tecido cardíaco e renal. Todavia, a reposição com insulina não impedi a disfunção diastólica cardíaca e o prejuízo no controle autônomo da circulação, sugerindo que tais disfunções possam estar associadas ao maior risco cardiovascular em portadores de diabetes mellitus tipo 1 sob tratamento com insulina.

### 5.1. Glicemia e controle metabólico

Os resultados do presente estudo confirmam a ação da injeção de STZ causando aumento de glicemia nos ratos dos grupos D e DTI ao início do protocolo. A STZ é uma droga citotóxica às células beta-pancreáticas, sendo que essa sua ação tóxica sobre o pâncreas é muito dependente de dano tecidual e indução de apoptose por produção de citocinas inflamatórias no local (REZENDE et al., 2012). Já foi mostrado que a

estreptozotocina causa o recrutamento de células imunes que terão como alvo as células do pâncreas produtoras de insulina, causando sua lise (MCEVOY et al., 1984). Desta forma, o diabetes induzido pela STZ é de origem autoimune, muito similar ao diabetes *mellitus* tipo 1 observado em humanos na clínica (CVETKOVIC et al., 2005).

A STZ vem sendo, há décadas, largamente utilizada para indução de diabetes em modelos animais, apesar de não ser inteiramente compreendido o mecanismo que a STZ leva a morte das células beta do pâncreas. Há estudos mostrando que a principal ação molecular da STZ é a inibição seletiva da enzima que faz ligação do grupo Nacetilglucosamina no oxigênio de proteínas (O-GlcNAc), chamada de O-GlcNAc seletiva N-acetil-beta-d-glucosaminidase (O-GlcNAcase) (KONRAD et al., 2001). A reação catalisada por essa enzima é um tipo de reação de glicosilação cíclica, mais parecida com o processo de fosforilação (HART; AKIMOTO, 2009). A toxicidade da STZ é altamente dependente de sua dose, sendo sugerido na literatura que afeta em menores doses seletivamente o pâncreas devido à O-GlcNAcase ser expressa em altos níveis nas células beta pancreáticas. Outros tecidos como o cérebro também são afetados pela STZ em doses maiores do que as tóxicas ao pâncreas (KONRAD et al., 2001).

Todavia, é importante destacar que no presente estudo evidenciamos que o tratamento com doses diárias de insulina NPH, por via subcutânea, 2U durante a manhã e 4U no período da tarde, foi eficiente em normalizar a glicemia neste modelo experimental de diabetes.

Neste sentido, vale lembrar que a reposição insulínica é o tratamento mais utilizado para pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. Revisões recentes de grandes ensaios clínicos randomizados que avaliavam mortalidade em pacientes com DM tipo 1 sob tratamento com insulina de forma convencional e de forma intensiva, mostraram que não há diferença entre mortalidade para ambos os tipos de tratamento entre os pacientes. Somente foi observada uma redução no aparecimento de nefropatia para pacientes tratados com controle intensivo da glicemia, porém esse tratamento também levou os pacientes a terem um maior índice de crises severas de hipoglicemia. Para as outras complicações do diabetes não foi observada diferença entre os dois tipos de tratamento, indicando que os pacientes teriam a mesma possibilidade de desenvolver complicações como retinopatias e neuropatias, independentemente de seu controle glicêmico (KÄHLER et al., 2014). Já na revisão de Fullerton e colaboradores em 2014, foi

encontrada uma diminuição no desenvolvimento de complicações nos pacientes portadores de DM tipo 1 sobre controle intensivo da glicemia (FULLERTON et al., 2014). Desta forma, para se entender o efeito desse tratamento sobre os índices aumentados de morbidade e mortalidade em pacientes DM tipo 1 mesmo sob bom controle glicêmico, a utilização do tratamento com insulina vem sendo estudada em modelos experimentais de diabetes, como o induzido por STZ.

Além da ação da insulina em diminuir a glicemia, este é um hormônio com ampla ação de sinalização; como vem sendo mostrado sobre o cérebro, no qual a insulina possui importante ação sobre memória e outras atividades cognitivas através da ativação de vias de sinalização mediadas pelo fosfoinosítideo 3-quinase (PI3-quinase) e Akt (SANTOS et al., 2014).

Desta forma, apesar de diferentes doses e de pobre controle glicêmico, a terapia insulínica mostra efeitos benéficos em estudos de administração em animais diabéticos por STZ que permanecem com quantidades basais insuficientes desse hormônio. Porém, não há um consenso na literatura sobre a dose de insulina que deve ser utilizada para um tratamento adequado em âmbito experimental. Por isto, diversas doses têm sido utilizadas a fim de repor insulina no modelo animal de DM induzido por STZ e atenuar a hiperglicemia. O estudo de Santos e colaboradores de 2014, utilizou insulina NPH na dose de 2U para glicemia de até 200 mg/dL e, a cada 100 mg/dL de glicose acima desse valor, mais 2U de insulina eram administradas por via subcutânea diariamente durante um mês. Esse tratamento não normalizou glicemia, mas a atenuou no grupo tratado em relação ao diabético. Quanto à hemoglobina glicada, também não houve normalização neste estudo, mas houve uma redução no grupo tratado em relação ao diabético. Entretanto, mesmo sem esse controle glicêmico rígido, fatores que indicavam maior fissão e biogênese mitocondrial em células do córtex cerebral dos ratos do grupo diabético foram normalizados no grupo tratado com insulina(SANTOS et al., 2014).

Outros métodos de tratamento com insulina NPH em ratos com DM tipo 1 são encontrados na literatura como através de implante de pellets de insulina que são trocados quando a glicemia do animal passa a ficar acima de 250 mg/dL, método que foi capaz de normalizar a glicemia e a hemoglobina glicada (MASSER et al., 2014). Em estudo de Thackeray e colaboradores em 2013, foi também utilizado implante de pellet de insulina

subcutâneo. Neste estudo foi descrita a dose liberada como 4U de insulina por dia, tendo sido observada normalização da glicemia, porém a Hb1Ac não foi avaliada (THACKERAY et al., 2013). Outro trabalho em 2013, de Melling e colaboradores foi feito com implante de pellet de insulina, porém sem conseguir um bom controle glicêmico, mas observando-se atenuação das disfunções cardíacas(MELLING et al., 2013). Alguns outros trabalhos que podem ser encontrados na literatura, evidenciando a grande diversidade de doses utilizadas, foram feitos com administração de insulina NPH subcutânea nas doses de 1,5U de insulina durante a manhã e 2,5U de insulina durante a tarde (PALMA et al., 2014), de 100U/kg de insulina subcutânea uma vez ao dia(CHEN et al., 2015), 8 a 15U/kg de insulina subcutânea uma vez ao dia ajustado de acordo com a glicemia medida anterior a administração diariamente (LE DOUAIRON LAHAYE et al., 2011), de 6 a 8U de insulina subcutânea uma vez ao dia (GU et al., 2014)e 5U de insulina nos três primeiros dias seguido de 4U de insulina nos dias restantes, subcutânea uma vez ao dia (ZHONG et al., 2001).

No presente trabalho utilizamos como base um estudo publicado em 2013 de David-Silva e colaboradores, no qual foi utilizado duas doses diárias de insulina NPH, 2U durante a manhã e 4U durante a tarde, atingindo um bom controle glicêmico. Vale lembrar que a insulina NPH é um análogo de ação intermediária tendo duração de 12 a 18 horas após a administração; evitando, desta forma, grandes flutuações da glicemia. É interessante notar que a própria administração da insulina NPH já mostrou ter efeito em aumentar a secreção de insulina pelas células beta-pancreáticas, assim como em aumentar o tamanho das ilhotas do pâncreas em ratos diabéticos por STZ (GU et al., 2014), o que talvez leve a necessidade de diminuição e readequação da dose ao longo do tempo.

Entre as ações hormonais, a insulina causa ativação de vias de sinalização que irão resultar em efeitos celulares finais, sendo os mais conhecidos a translocação de vesículas contendo receptores de glicose, os GLUT-4, do *pool* intracelular para a membrana plasmática, ativação da síntese de glicogênio e proteínas e transcrição de genes específicos que regulam o metabolismo energético e crescimento celular (CARVALHEIRA et al., 2002).

Neste sentido, vale lembrar que a principal forma de captação de glicose pela célula é feita pelo mecanismo de difusão facilitada. Participam desse processo algumas proteínas de membrana como GLUT 1-4. Eles pertencem a subfamília classe I dentre a

família GLUT, os receptores de 1 a 4 são transportadores de glicose, possuindo expressão específica por célula/tecido (JOOST; THORENS, 2001). O GLUT-1 faz o transporte basal de glicose para dentro das células, porém o estímulo pela insulina é importante para aumentar a captação desse substrato energético, como em momentos de alta disponibilidade do substrato no período pós-prandial. A insulina se liga ao seu receptor localizado na membrana plasmática e causa a ligação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) com a enzima PI3-quinase, levando a sua ativação, isto desencadeia as sinalizações intracelulares através de reações de fosforilação (MACHADO, 1998). Assim, na musculatura esquelética e cardíaca, vesículas contendo receptores GLUT-4 se movem para a superfície celular, aumentando a densidade dessas proteínas transportadoras na membrana (TSAKIRIDIS et al., 1995).

Na ausência da insulina, como no DM tipo 1, ocorre um aumento da glicemia e a permanência do organismo em um estado catabólico, como o estimulado pelo glucagon. Além disto, a insulina tem efeito direto de inibição de transcrição de genes que codificam enzimas que participam da gliconeogênese e glicogenólise. A insulina também estimula a síntese de ácidos graxos no fígado em períodos de excesso de carboidrato (CARVALHEIRA et al., 2002). Sem a ação do hormônio insulina há acúmulo de glicose no sangue, o que também leva a menor produção de ácidos graxos e maior utilização das vias de produção de energia alternativas como a gliconeogênese e glicogenólise. Possivelmente, essa maior quebra de substratos por vias energéticas alternativas (com menor utilização de glicose) e menor produção de gordura estão relacionadas ao crescimento prejudicado dos ratos no grupo diabético. Já foi mostrado na literatura que animais com DM tipo 1 induzido por STZ, além da diminuição da massa corporal e do aumento de glicemia, também apresentam aumento de ácidos graxos livres e triacilglicerol no plasma (MALFITANO et al., 2015). De fato, neste nosso presente estudo foi também observado redução da massa corporal no grupo diabético em relação ao grupo controle, o que pode ser visto a partir da primeira semana de diabetes por STZ, e que perdurou durante as quatro semanas. Somado a isto, o grupo diabético ganhou menos massa corporal quando comparado o início e o fim do protocolo, sendo que dois animais dentro do grupo diabético perderam massa corporal ao longo das 4 semanas de protocolo.

A deficiência insulínica, seja no diabetes ou em casos de jejum, é associada com quebra de proteínas da musculatura esquelética levando a prejuízo muscular. Recentes

estudos sugerem que essa degradação muscular ocorre devido a aumento de conjugação de ubiquitina às proteínas; a ubiquitina se liga a proteínas sinalizando para que elas sejam degradadas por proteossomas. Essa via de degradação proteica está aumentada em ratos diabéticos por STZ e é a mesma via encontrada aumentada em pacientes com câncer, caquexia, sepses e hipertireoidismo (LECKER et al., 1999).

É importante destacar que no tempo estudado (30 dias de tratamento com insulina), o grupo DTI não chegou a ter uma massa corporal maior do que o grupo controle, mas mostrou um padrão de ganho de massa (ao longo dos 30 dias) diferente dos ratos diabéticos sem tratamento, tendo aumentos significativamente mais expressivos a cada semana. Neste sentido, sabe-se que a terapia insulínica leva a um ganho de massa corporal moderada em humanos e esse ganho está diretamente relacionado a dose e com menores índices de massa corporais basais ao início do tratamento (BALKAU et al., 2014). No entanto, foi relatado em outro estudo com reposição insulínica, que o ganho de massa corporal no grupo diabético tratado com insulina por 30 dias foi maior do que o dos ratos do grupo controle (SANTOS et al., 2014).

Os dados da gaiola metabólica obtidos no presente estudo indicam que os animais diabéticos não possuíam menor massa corporal por se alimentarem menos; pelo contrário, o grupo diabético consumia mais água e comida do que os dois outros grupos estudados (C e DTI). No entanto, esse grupo excretava mais urina e fezes, sugerindo que não era realizada a metabolização dos nutrientes em prol de um ganho de massa corporal e crescimento normal do animal. Esses valores aumentados de volume urinário e de peso de fezes no grupo D permaneceram durante os dias de protocolo, se mostrando alterados nas avaliações de 15 e 30 dias de acompanhamento em relação ao grupo controle.

Vale lembrar que o rim possui uma grande importância na manutenção da homeostase glicêmica, seja por sua participação na formação de glicose por gliconeogênese no córtex renal (CERSOSIMO et al., 2014; KREBS et al., 1965) ou pela ação de transportadores renais de glicose (CERSOSIMO et al., 2014). O processamento da glicose pelo rim inclui filtração glomerular livre, com reabsorção tubular proximal completa para o espaço de fluido intersticial renal (CERSOSIMO et al., 2014). Com a hiperglicemia, há o desenvolvimento de poliúria como observado em animais diabéticos que mantêm a glicemia elevada cronicamente. Um estudo de Blantz e colaboradores de

1983 mostrou o mecanismo pelo qual ocorre o aumento da diurese em ratos em decorrência de uma hiperglicemia aguda, no qual foi mostrado aumento da taxa de filtração dos néfrons e diminuição da reabsorção absoluta na região dos túbulos proximais (BLANTZ et al., 1983). A taxa de reabsorção de glicose nos túbulos proximais só é linear a carga de glicose que atinge a membrana luminal dentro de níveis normais de glicemia; quando a quantidade de glicose satura os transportadores responsáveis, se atinge a capacidade reabsorção tubular dos rins máxima, chamada de Tmax e a glicose passa a ser eliminada na urina (CERSOSIMO et al., 2014). Desta forma, o filtrado glomerular possui uma pressão osmótica elevada; todavia, no estudo de Blantz essa não se mostrou determinante para a redução da taxa de reabsorção absoluta nos túbulos proximais (BLANTZ et al., 1983).

Contudo, os resultados do presente estudo evidenciam que o tratamento com insulina e, consequente, a normalização da glicemia, foram capazes de diminuir o volume de urina excretado nos animais diabéticos tratados, mostrando ter um efeito benéfico sobre a função renal, e, desta forma, proporcionando aos animais diabéticos tratados uma normalização também do consumo de água. Esses achados foram observados quando avaliados tanto em 15 quanto 30 dias de protocolo, mostrando que o tratamento com insulina manteve a normalização desses parâmetros de função renal ao longo do período estudado.

O aumento no consumo de alimento pode ocorrer nos animais diabéticos como uma resposta ao estado semelhante ao jejum que esses ratos se mantêm, no qual não há liberação de insulina após a alimentação. Sabe-se que o estômago produz substâncias como a grelina em resposta a fome; os níveis de grelina no plasma aumentam durante o jejum e diminuem após a ingestão de glicose e lipídios (NONOGAKI, 2008). Já foi observado aumento no RNA mensageiro de grelina no estômago de ratos diabéticos por STZ (SÖNMEZ et al., 2015), assim como há um aumento de pelo menos 2 vezes a concentração de grelina no plasma desses ratos após 1 dia da indução do diabetes com STZ, sugerindo que esse hormônio possui uma contribuição para o desenvolvimento do estado de hiperfagia que começa a partir do 3 dia da indução do diabetes (GELLING et al., 2004). Vale destacar que com a administração de insulina no grupo DTI a quantidade de comida consumida assim como de fezes excretada foi normalizada, observando-se valores semelhantes aos dos ratos do grupo C, tanto em 15 quanto em 30 dias de

acompanhamento. Tais resultados em conjunto sugerem que o tratamento com insulina induz efeitos benéficos no controle metabólico em ratos diabéticos por STZ.

## 5.2. Avaliações da morfometria e função cardíaca

O coração dos ratos diabéticos após 30 dias de hiperglicemia crônica apresentaram diversas alterações na morfometria, como aumento do diâmetro da câmara do VE no final da diástole, medida que caracteriza a maior dimensão cardíaca, assim como diminuição da espessura da parede posterior do VE e da espessura relativa de parede. Essas alterações na estrutura cardíaca são características da cardiomiopatia dilatada do diabetes (CMPDD), uma doença que se manifesta principalmente nos casos de DM tipo 1 de origem autoimune (SEFEROVIĆ; PAULUS, 2015) e é caracterizada por aumento das dimensões ventriculares e prejuízo de função sistólica e diastólica (MCNALLY et al., 2013). O diagnóstico e tratamento da CMPDD são de grande importância, pois os pacientes que a possuem têm risco de rápida progressão da doença para insuficiência cardíaca congestiva e arritmias (MCNALLY et al., 2013).

A cardiomiopatia dilatada surge em pacientes não diabéticos por motivos genéticos como mutação em genes de diversas proteínas envolvidas na formação do sarcômero cardíaco (SPUDICH, 2014), do citoesqueleto, do esqueleto nuclear, proteínas mitocondriais e proteínas do trânsito de cálcio (MCNALLY et al., 2013). Essas proteínas podem ser afetadas também no estado do diabetes durante o desenvolvimento da CMPDD, sendo que disfunção do endotélio da microvasculatura cardíaca, produtos finais de glicação avançada (SEFEROVIĆ; PAULUS, 2015), estresse oxidativo (o que inclui dano oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio -ERONs), morte de cardiomiócitos e fibrose miocárdica (LIU et al., 2014) participam desse processo. Esses fatores levam a um remodelamento tecidual que resulta nas alterações morfométricas e funcionais observadas na cardiomiopatia.

O principal substrato energético do coração são os ácidos graxos. No estado de diabetes apesar do aumento de glicose, ácidos graxos livres e triacilglicerol no plasma, não há aumento de ácidos graxos livres no VE. Em conjunto, há um aumento significativo de substratos de reserva como triacilglicerol e glicogênio no VE. Também já foi mostrado que esses animais diabéticos diminuem a oxidação de forma anaeróbica com redução da atividade da hexoquinase (enzima reguladora da glicólise), assim como também possuem

menor disponibilidade de ATP em tecido cardíaco. Desta forma, esses animais indicam um condicionamento do metabolismo energético de forma que possa atuar sobre baixos níveis energéticos (MALFITANO et al., 2015). Além disto, é observado aumento de fator-1 alfa induzido por hipóxia no VE de ratos diabéticos causando aumento de vascularização no tecido antes que haja um processo isquemia (MALFITANO; DE SOUZA JUNIOR; et al., 2014), sendo possível que esse aumento seja uma resposta a maior necessidade de oxigênio por esse tecido, devido ao aumento do condicionamento do metabolismo para vias aeróbias, como a oxidação de ácidos graxos, que o coração passa a atuar de maneira acentuada e ao baixo nível de ATP.

Associado à modificação no metabolismo energético, o estado catabólico citado anteriormente presente nos animais com falta de hormônio insulina, no qual ocorre quebra de proteínas e lipídios, sendo possivelmente uma tentativa de geração de energia por vias alternativas, assim como do aumento da via ubiquitina-proteassoma em musculatura esquelética levando a degradação proteica, pode se assemelhar com as alterações que ocorrem em nível de músculo cardíaco, que é um músculo em constante atividade e que necessita de muita energia. A hipótese de maior degradação tecidual corrobora com os achados do presente trabalho que mostrou diminuição de massa do VE no grupo D em relação ao grupo C, mas que pode estar associado não somente a atrofia de células, como também a uma menor densidade de células cardíacas funcionais, considerando que existem dados sobre aumento de fatores apoptóticos e fibrose no coração de ratos diabéticos (MALFITANO et al., 2010). É importante destacar que o prejuízo no metabolismo energético clássico está possivelmente associado às mudanças de estrutura cardíaca observadas nos animais diabéticos por STZ, pois o tratamento com insulina, normalizando glicemia, restabeleceu os parâmetros de morfometria no coração dos ratos do grupo DTI.

Acredita-se que o remodelamento cardíaco tem influência nas disfunções que o acompanha na CMPDD, como as disfunções no processo de sístole e de diástole. A disfunção sistólica pode ser observada pela redução da fração de encurtamento, podendo na CMPDD existir uma fração de ejeção preservada ou, mais comumente, diminuída (SEFEROVIĆ; PAULUS, 2015). O modelo de DM tipo 1 induzido por STZ resulta em um fenótipo da doença semelhante a esse descrito. No nosso presente estudo, os animais do grupo D não apresentaram diferença quanto à fração de ejeção, no entanto, mostraram

uma fração de encurtamento reduzida em relação ao grupo controle. O trabalho de Malfitano e colaboradores de 2015 não encontrou prejuízo da função sistólica de ratos diabéticos por STZ após 30 dias de protocolo, não havendo redução tanto da fração de ejeção quanto da fração de encurtamento (MALFITANO et al., 2015), em contrapartida existem estudos mostrando disfunção sistólica e diastólica nos ratos diabéticos por STZ após 30 dias, sendo a disfunção sistólica caracterizada tanto por redução da fração de ejeção quanto da fração de encurtamento (LE DOUAIRON LAHAYE et al., 2011; WICHI et al., 2007).

Esse déficit no processo de contração pode ser explicado pela disfunção no processamento de cálcio pelos cardiomiócitos. Já foi observado em ratos diabéticos por STZ aumento de fosfolamban, uma proteína chave na regulação da  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase do retículo saco(endo)plasmático (SERCA2), inibindo sua ação por diminuir sua afinidade com o cálcio. Assim como também foi demonstrada diminuição de expressão de SERCA2 e de receptor rianodina ligado a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (RyR) nos ratos diabéticos de 6 semanas, sendo que em 4 semanas já havia menor afinidade aparente do retículo sarcoplasmático pela recaptação de cálcio nos animais diabéticos. De forma importante, o tratamento com insulina por 6 semanas nesses animais diabéticos foi capaz de normalizar a expressão das proteínas envolvidas no processamento de cálcio, assim como restaurar a capacidade contrátil do coração (ZHONG et al., 2001). Deve-se levar em consideração um conhecimento concreto na literatura de que a sinalização da insulina a partir da ativação de seu receptor participa da regulação da transcrição e translação de vários genes (MOULE; DENTON, 1997), inclusive no miocárdio (DECKER et al., 1995; VELLOSO et al., 1998), podendo ela atuar sobre as proteínas que controlam o transporte de cálcio causando melhora dessa disfunção.

A disfunção diastólica é uma das manifestações clínicas iniciais da cardiomiopatia diabética, aparecendo antes inclusive da disfunção sistólica. Ela é caracterizada por aumento da rigidez da parede ventricular e aumento do tempo de relaxamento diastólico (LIU et al., 2014). Os animais do grupo D do presente trabalho apresentaram diminuição da relação E/A, aumento do tempo de desaceleração da onda E e maior tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca, caracterizando assim uma disfunção diastólica neste grupo. É importante destacar, no entanto, que o tratamento com insulina e a normalização da glicemia, interessantemente, apesar de terem conseguido

restaurar a massa ventricular, assim como outros parâmetros de morfometria e função sistólica, não foi capaz de reverter a disfunção diastólica, sendo que os três parâmetros de função diastólica descritos como alterados no grupo D permaneceram prejudicados no grupo DTI.

Diversos ensaios clínicos utilizando tratamentos de insuficiência cardíaca sistólica em pacientes com insuficiência cardíaca devido a uma disfunção diastólica e com fração de ejeção preservada, já foram feitos e esses tiveram resultados desapontadores por essas terapias serem ineficazes nesses pacientes; sugerindo que as disfunções diastólica e sistólica possuem diferentes tipos de patogenia (JEONG; DUDLEY, 2015). Nossos resultados corroboram tais achados, mostrando que o tratamento com insulina nos ratos diabéticos normalizou a função sistólica, mas não diastólica, sugerindo que existem outros fatores envolvidos no desenvolvimento da disfunção diastólica precoce em ratos diabéticos mesmo após normalização da glicemia.

Há estudos que mostram que a insuficiência cardíaca diastólica, uma doença que é a causa de grandes índices de morbi e mortalidade e que não possui terapias efetivas para diminuir suas complicações nos pacientes, resulta de alterações energéticas no miocárdio, provenientes de um metabolismo energético alterado e aumento de estresse oxidativo (BATES et al., 2014). De fato, o relaxamento do miocárdio é um processo dependente de energia. A energia requerida pelo miocárdio pode ser dividida esquematicamente em 3 componentes: o metabolismo basal, a energia usada na sístole e a energia usada na diástole. A energia do metabolismo basal é usada para manter a integridade das estruturas cardíacas e para as reações bioquímicas de síntese necessárias para o crescimento. Apesar da energia usada durante a sístole corresponder a geração de força, sendo ATP hidrolisado pela atividade da actina-miosina ATPase, pouca energia é esperada que seja usada durante o acoplamento excitação-contração em si (LORELL; GROSSMAN, 2012). Já a diástole necessita de energia para voltar o cálcio do sarcoplasma para o retículo sarcoplasmático, assim como para expulsar o cálcio que entrou na célula durante a fase platô do potencial de ação; e mesmo que a troca sódiocálcio não seja em todo um mecanismo com gasto de energia, muitas vezes é necessário expulsar o cálcio utilizando a via sódio-potássio ATPase, tendo também bombas de cálcio dependentes de ATP. Sendo assim, quando a produção de ATP é limitada, o cálcio pode se manter fixo a troponina por parte ou durante toda a diástole causando uma diminuição do

tempo de relaxamento isovolumétrico e da distensibilidade do miocárdio(POULEUR, 1990).

Em um interessante estudo recentemente publicado por Tocchetti e colaboradores de 2015, foi avaliada a respiração de mitocôndrias isoladas de cardiomiócitos de cobaias diabéticas por STZ e cobaias diabéticas tratadas com insulina, o complexo I não apresentou diferença entre os grupos, no entanto, para o complexo II e IV houve uma diminuição da capacidade respiratória, avaliada pelo substrato desses complexos respiratórios, e esse prejuízo estava inclusive mais acentuado nos corações de cobaias diabéticas tratadas com insulina (TOCCHESSI et al., 2015). Nesse estudo de Tocchetti, o tratamento com insulina não foi capaz de reverter a disfunção de contratilidade cardíaca, porém quando os corações das cobaias diabéticas eram tratados com palmitato, um ácido graxo, com capacidades antioxidantes, houve efeito benéfico na função contrátil dos cardiomiócitos dos animais diabéticos; provavelmente por esse ácido graxo possibilitar um menor estresse oxidativo e uma maior produção de energia em conjunto, considerando que ácidos graxos são os substratos energéticos principais ao coração (TOCCHESSI et al., 2015).

Um dos motivos que pode explicar o porquê a reposição insulina não é suficiente para normalizar todos os danos do diabetes é o fato de que o tratamento com insulina exógena em pacientes com DM tipo 1, ainda os deixa sujeitos a variações da glicemia durante o dia. Essa variação glicêmica é comumente observada através dos níveis de HbA1c; entretanto, a HbA1c somente explica menos de 25% da variação no risco de desenvolvimento de complicações em pacientes diabéticos, não se correlacionando com a variabilidade da glicemia nesses pacientes durante o dia (EL-OSTA et al., 2008). Nos animais tratados com insulina, também observa-se variações da glicemia, considerando esse um fator de risco independente da HbA1c. Em estudo da influência de pico de hiperglicemia transitória em camundongos não diabéticos, através da indução de hiperglicemia durante 6 horas e depois normalização dela por 6 dias, El-Osta e colaboradores em 2008 mostraram que a hiperglicemia induziu importantes alterações epigenéticas que levaram ao aumento da expressão da subunidade p65 do fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ b) que perduraram mesmo após os 6 dias de normalização da glicemia (EL-OSTA et al., 2008). Isso nos leva a concluir que os picos hiper e hipoglicêmicos que

possam ocorrer em animais diabéticos tratados com insulina ainda podem alterar importantes fatores em seus organismos.

Desta forma, outras medidas para atenuar esse prejuízo remanescente têm sido estudadas. O tratamento com insulina em ratos Wistar machos diabéticos por STZ, levou a um pobre controle glicêmico no trabalho de Melling e colaboradores de 2013, evidenciando-se que ainda permaneciam prejuízos de função cardíaca e de densidade óssea decorrentes do diabetes. Entretanto, nesse estudo o tratamento com insulina associado ao treinamento físico foi capaz de amenizar esses efeitos deletérios, demonstrado pelo aumento do débito cardíaco e da relação E/A dos animais diabéticos (MELLING et al., 2013). Em outro trabalho com associação do tratamento com insulina e exercício físico, o tratamento com insulina sozinho não foi capaz de normalizar a função sistólica, nem a diastólica de animais diabéticos medidas pela técnica de Langendorff; somente quando combinado ao treinamento físico, o mesmo foi capaz de normalizar o prejuízo sobre a função sistólica, ainda sem alteração benéfica na função diastólica (LE DOUAIRON LAHAYE et al., 2011). Deve-se considerar que ambos os trabalhos iniciaram o tratamento com insulina após cinco dias e uma semana da indução por STZ, respectivamente, tempos nos quais já se observa aparecimento do prejuízo cardiovascular e autonômico (MAEDA; FERNANDES; LULHIER; et al., 1995; MAEDA; FERNANDES; TIMM; et al., 1995; MONCKTON; PEHOWICH, 1980; YAGIHASHI; SIMA, 1985).

No trabalho de Lahaye e colaboradores em 2011, foi sugerido que a ineeficácia dos dois tratamentos associados em normalizar a disfunção diastólica tinha haver com o tempo empregado de protocolo (8 semanas), lembrando que a disfunção diastólica surge antes da disfunção sistólica e sendo assim envolve provavelmente um mecanismo mais comprometido (LE DOUAIRON LAHAYE et al., 2011).

O fato de o treinamento físico ser capaz de atuar sobre essas disfunções cardíacas mesmo sem a normalização dos índices glicêmicos, como evidenciado pela melhora da função contrátil de ratos diabéticos por STZ treinados em esteira (DE ANGELIS; OLIVEIRA; et al., 2000), indica que existem diferentes fatores envolvidos no desenvolvimento dessas complicações cardíacas. Considerando que algumas dessas complicações podem ser revertidas e/ou atenuadas sem a normalização da glicemia

através do treinamento físico, se tornam necessários mais estudos mostrando se esse mecanismo pelo qual o treinamento físico age causando seu efeito benéfico envolve o prejuízo residual remanescente deixado ao sistema cardiovascular mesmo após o tratamento com insulina, como pode ser observado pela permanência da disfunção diastólica neste modelo.

### **5.3. Pressão arterial e frequência cardíaca**

A diminuição da PA e FC nesse modelo de DM induzido por STZ é bem conhecida (DALL'AGO et al., 2002; DE ANGELIS; OLIVEIRA; et al., 2000; MAEDA; FERNANDES; LULHIER; et al., 1995) e tem sido associada a prejuízos no sistema cardiovascular assim como em seus mecanismos de regulação. A redução da PA pode decorrer de alteração da resistência vascular periférica (BRANDS; CLOUD, 2003). No entanto, em estudo de Freitas e colaboradores em 2015 não foi observada diferença na resistência vascular periférica total nos ratos diabéticos por STZ (FREITAS et al., 2015). No entanto, estudos evidenciam que o débito cardíaco está reduzido nos animais diabéticos (DEBLIEUX et al., 1993; FREITAS et al., 2015; PAULSON et al., 1988) e um dos motivos seria a diurese osmótica provocada pela hiperglicemia (JACKSON; CARRIER, 1983). Outro motivo que se pode considerar é o prejuízo da contratilidade cardíaca que pode ocorrer, conforme discutido anteriormente, por diminuição de proteínas importantes envolvidas no processamento de cálcio (ZHONG et al., 2001), assim como aumento de estresse oxidativo. Como o treinamento físico em animais diabéticos consegue restaurar a PA para os valores observados no controle e esse treinamento também restaura débito cardíaco, contratilidade ventricular e FC, acredita-se que a diminuição da PA observado nos animais do grupo D seja relacionada a prejuízo desses fatores (DE ANGELIS; OLIVEIRA; et al., 2000; FREITAS et al., 2015; HARTHMANN et al., 2007). Desta forma, a normalização da PA observada no grupo DTI pode estar associada a melhora da FC e da função sistólica cardíaca observada nesses animais, promovendo melhora do débito cardíaco.

É interessante notar que a PA em pacientes diabéticos se correlacionou positivamente com o tempo de aparecimento da doença e de forma menos clara foi associada com a dose de insulina usada (KEEN et al., 1975). Há um aumento da PA em pacientes DM dependentes de insulina ao longo do tempo, principalmente por

comprometimento renal (VIBERTI et al., 1987). Neste sentido, durante o tempo de nosso estudo, não houve alteração na PA no grupo DTI, permanecendo com valores semelhantes aos do grupo C.

Já a FC diminuída nos animais diabéticos pode não só estar relacionada com a disfunção autonômica prejudicando a regulação importante desse sistema sobre o coração e nodo sinoatrial (DE ANGELIS et al., 2002), como também é sugerido que a hiperglicemias cause prejuízo da geração de impulso pelo nodo sinoatrial, o que se reflete também no prejuízo da frequência cardíaca intrínseca (DE ANGELIS; OLIVEIRA; et al., 2000; MAEDA; FERNANDES; TIMM; et al., 1995; SENGES et al., 1980).

No presente estudo, o tratamento com insulina foi capaz de restaurar aos valores tanto a PA quanto a FC no grupo DTI, assemelhando-se aos observados no grupo controle. Quanto aos fatores descritos acima como capazes de influenciar na FC e que foram avaliados neste presente estudo, a frequência cardíaca intrínseca, o tônus vagal e o tônus simpático cardíacos obtiveram melhora após a normalização da glicemia no grupo DTI. Podendo, desta forma, sugerir que a restauração da FC esteja associada com a normalização da função autonômica sobre o nodo sinoatrial, bem como com o restabelecimento da FC intrínseca.

#### **5.4. Avaliação autonômica cardiovascular**

Em pacientes diabéticos é observada disfunção autonômica, uma complicação crônica do diabetes, denominada como neuropatia autonômica diabética e que possui prevalência entre 20 a 70% da população diabética dependendo do estudo (FLEISCHER, 2012) e do critério usado para identificação (POP-BUSUI et al., 2010). Ziegler e colaboradores em 1992, usando a avaliação da variabilidade da FC através da análise espectral detectaram que cerca de 25,3% da população diabética tipo 1 e 34,3% dos diabéticos tipo 2 possuíam alguma alteração na modulação autonômica sobre o coração, o que é chamado de neuropatia autonômica cardíaca.

No presente trabalho foi observada uma diminuição do tônus simpático e parassimpático sobre o coração dos ratos no grupo D. Isso vai de acordo com dados de diversos outros trabalhos que mostram prejuízo no controle do sistema nervoso autonômico sobre o coração desses animais, mais caracterizado pela diminuição da sua

atuação no coração e um consequente desbalanço entre os dois sistemas (simpático e parassimpático). As alterações referentes a disfunção autonômica já podem ser observadas nesse modelo de diabetes a partir do terceiro dia após a indução por STZ (MONCKTON; PEHOWICH, 1980; YAGIHASHI; SIMA, 1985). No nosso grupo já se observou disfunção autonômica, caracterizada por redução do tônus vagal sobre o coração, 5 dias após a indução do diabetes (MAEDA; FERNANDES; TIMM; et al., 1995). Tem-se que a disfunção autonômica ocorre primeiramente como um prejuízo no nervo vago que segue cronicamente afetando os nervos simpáticos também.

A hiperglicemia crônica tem sido apontada como promotora de progressiva disfunção em nervos, afeta nervos autonômicos e em paralelo outros nervos como os periféricos, causando variados tipos de neuropatias. As neuropatias são conhecidas por afetar primeiramente fibras longas, o que vai de acordo com o fato da manifestação precoce da neuropatia autonômica sobre o nervo vago que é responsável por cerca de 75% da atividade parassimpática (POP-BUSUI et al., 2010).

Existem autores que sugerem que a disautonomia no diabetes seja decorrente de uma depressão da transmissão de impulso na sinapse ganglionar desses neurônios, desencadeada pela hiperglicemia (CAMPANUCCI et al., 2010). Desta forma, gânglios simpáticos suscetíveis ao desenvolvimento de neuropatia devido ao diabetes foram identificados, como é o caso dos gânglios celíaco e mesentérico superior, enquanto o gânglio do nervo cervical superior é resistente a esse desenvolvimento (CARROLL et al., 2004). Também já foi mostrado que esses nervos que desenvolvem a neuropatia diabética são mais suscetíveis a ação de estresse oxidativo do que o nervo cervical (SEMRA et al., 2006).

Pode-se assim concluir que a disfunção autonômica caracterizada pela redução do tônus simpático e vagal no coração dos ratos diabéticos esteja envolvida com produção aumentada de estresse oxidativo devido ao estímulo hiperglicêmico, defeitos no metabolismo energético e na microcirculação desse tecido, considerando que no grupo DTI, com a normalização da glicemia, houve um restabelecimento do tônus autonômico sobre o coração, associado com melhora do estresse oxidativo.

O prejuízo do sistema nervoso autônomo sobre o coração pode ser detectado antes que haja alguma alteração clínica no sistema cardiovascular, isto é feito através da

avaliação da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial sistólica, que são parâmetros cardiovasculares modulados diretamente, a todo o momento, mesmo no repouso, por estímulos autonômicos.

O primeiro trabalho que mostrou alteração da FC e da variabilidade da FC em diabéticos antes de qualquer alteração ou sintoma clínico de neuropatia, foi de Murray e colaboradores em 1975. Foi constatada uma variabilidade da FC reduzida nos pacientes diabéticos independente de aparecimento de alguma complicaçāo, sendo que se dividido o grupo diabético entre os que apresentavam sintomas de retinopatia proliferativa, o prejuízo da variabilidade da FC era ainda maior, observado pelo parâmetro no domínio do tempo, que avalia a distribuição da variação de intervalos R-R (MURRAY et al., 1975).

É importante destacar que uma variabilidade da FC mais preservada após infarto do miocárdio foi capaz de predizer menor mortalidade dessa população, mostrando-se a importância de um sistema nervoso autonômico adequado atuando sobre o sistema cardiovascular para que haja seu bom funcionamento e menores índices de morbi e mortalidade (BIGGER et al., 1992).

Considerando o acima exposto, nos animais do grupo D podemos observar o prejuízo na variabilidade da FC, através da diminuição do desvio padrão do intervalo de pulso e da variância do intervalo de pulso nesse grupo. Existem diversos estudos avaliando sistema nervoso autonômico e sua modulação sobre o coração que obtiveram achados em ratos diabéticos em acordo com o nosso (MOSTARDA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013; SILVA et al., 2012). Todavia, é importante destacar que o tratamento com insulina no presente estudo foi capaz de restabelecer esses dois parâmetros avaliados no grupo DTI.

Em relação à variabilidade da PAS, foi encontrada redução da variância da PAS no grupo de ratos diabéticos, também semelhante ao mostrado anteriormente em outros trabalhos do grupo onde é encontrado prejuízo na modulação autonômica da pressão arterial sistólica (MOSTARDA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013; SILVA et al., 2012), sendo que com a redução adicional do desvio padrão da PAS quando além de diabéticos, os ratos também são hipertensos, como no caso de SHR induzidos diabetes por STZ (BRANDS; CLOUD, 2003). Essa diminuição da variância da PAS indica uma

modulação da PAS prejudicada nesses animais, o que perdurou mesmo após o tratamento com insulina no grupo DTI.

Além da avaliação da modulação autonômica e do tônus cardíaco, o mecanismo barorreflexo é considerado na literatura como um marcador para avaliação da função autonômica (IRIGOYEN et al., 2005). O barorreflexo é um mecanismo para regulação da pressão arterial de forma rápida e reflexa. Variações na pressão arterial são captadas por barorreceptores localizados no arco da aorta e no seio carotídeo. Essas variações fazem com que sinais sejam enviados por nervos aferentes até o sistema nervoso central, onde irá retornar uma resposta por nervos eferentes, direto ao coração, resultando em taquicardia ou bradicardia, dependendo do estímulo inicial ter sido de redução da PA ou de aumento, respectivamente. Os nervos eferentes do sistema barorreflexo que atuam sobre o coração são nervos do sistema nervoso autônomo, nervos simpáticos para a resposta taquicárdica e o nervo vago para a resposta bradicárdica (IRIGOYEN et al., 2005).

Além disto, a diminuição da resposta do barorreflexo sobre o coração às variações de pressão, o que corresponde a menor sensibilidade desse sistema, foi relacionada com maiores índices de mortalidade em pacientes pós-infarto do miocárdico (LA ROVERE et al., 1998). Foi mostrado que pacientes que possuíam a sensibilidade barorreflexa mais preservada, possuíam uma curva de mortalidade menor; em conjunto esse estudo mostrou que a reabilitação desses pacientes com exercício físico, levava a diminuição da mortalidade somente se os indivíduos respondessem melhorando a sensibilidade barorreflexa (LA ROVERE et al., 2002). Sendo assim a melhora do controle nervoso autônomo sobre o sistema cardiovascular parece ser um fator determinante de mortalidade e de melhora no estado de pacientes infartados (LA ROVERE et al., 2002). Essa relação de pior prognóstico com piora da sensibilidade barorreflexa também foi observada em outras doenças crônicas. No caso de ratos diabéticos por STZ, nosso grupo já evidenciou prejuízo desse sistema de regulação de pressão arterial, o que conseguiu ser restaurado pelo treinamento físico (HARTHMANN et al., 2007; MOSTARDA et al., 2009; SILVA et al., 2012).

No presente trabalho foi observado prejuízo de ambas as alças do barorreflexo nos animais diabéticos, similar a outros trabalhos que avaliaram a sensibilidade barorreflexa em ratos diabéticos (HARTHMANN et al., 2007). No entanto, o tratamento com insulina

só se mostrou eficaz em reverter o prejuízo na resposta bradicárdica, permanecendo com redução da sensibilidade barorreflexa para a resposta taquicárdica nos animais do grupo DTI. De fato, nesse modelo de diabetes é observada disfunção autonômica, que pode ser caracterizada pelo prejuízo das respostas taquicárdicas e bradicárdicas do barorreflexo, que são dependentes da modulação de nervos simpáticos e parassimpáticos.

É interessante notar que o tratamento com insulina no presente trabalho, apesar de normalizar o tônus simpático e parassimpático sobre o coração, não foi capaz de restabelecer a resposta taquicárdica do mecanismo barorreflexo, sugerindo que o prejuízo que permanece pode estar relacionado com alguma outra estrutura envolvida nesse mecanismo de ajuste de pressão arterial além da via eferente. De fato, o prejuízo nesse sistema pode ter origem nas vias eferentes e aferentes das duas alças de resposta do barorreflexo, sendo essas vias mais comumente estudadas. No entanto, pode ocorrer também por alterações da mediação central desse reflexo ou dos receptores do sistema nervoso autônomo no coração (DE ANGELIS et al., 2007). Em estado de hiperglicemia observado no coração de ratos diabéticos, houve diminuição de receptores pós-sináptico beta-1 de aproximadamente 45% e de beta-2 por volta de 27% dos valores observados em ratos não diabéticos. O tratamento com insulina nos animais diabéticos conseguiu restaurar somente de forma parcial essa redução de receptores adrenérgicos (THACKERAY et al., 2013).

Estudos recentes mostram dados controversos quanto ao benefício do tratamento intensivo com insulina em pacientes diabéticos tipo 2, nos quais atingir os valores adequados de hemoglobina glicada (<7%) através de controle glicêmico intensivo foi relacionado com desenvolvimento de neuropatia autonômica e morte súbita (FLEISCHER et al., 2015; POP-BUSUI et al., 2010). A utilização da insulina para atingir a meta de HbA1c não se correlacionou com a variação da glicemia que o indivíduo tinha durante o dia. Em um trabalho que verificou os efeitos da variação da glicemia sobre a variabilidade da FC, foi observado que a hemoglobina glicada não foi suficiente para refletir os prejuízos glicêmicos, especialmente em pacientes com disfunção autonômica, sendo obtida baixa correlação entre a variação glicemia e os valores de Hb1Ac (FLEISCHER et al., 2015). Desta forma, podemos sugerir que o prejuízo observado nos ratos diabéticos tratados com insulina no controle autônomico cardiovascular (mais especificamente na variabilidade da PAS e no barorreflexo), mesmo após atingir um bom controle glicêmico,

tenha relação com os danos causados pela variação da glicemia que ainda ocorre durante o dia mesmo sob tratamento com insulina exógena.

### **5.5. Avaliações de estresse oxidativo**

A hiperglicemia é considerada como o principal fator que desencadeia as complicações do diabetes, o estado de hiperglicemia não só induz o aumento de estresse oxidativo nos tecidos como aumenta a formação de produtos finais de glicação avançada, que são formados por consequência da alta concentração de glicose sanguínea que se liga de forma não enzimática a proteínas e lipídios, principalmente oxidados (LIU et al., 2014). Uma das formas que a hiperglicemia leva a aumento de estresse oxidativo é pela ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e/ou aumento de atividade do sistema nervoso simpático(BRANDS; CLOUD, 2003; DHALLA et al., 2014), no qual aumenta a quantidade de angiotensina II que desencadeia apoptose, fibrose, inflamação vascular e dano oxidativo (LIU et al., 2014). Além disto, o estresse oxidativo pode se originar no retículo endoplasmático ou na mitocôndria, assim como através de outros mecanismos a exemplo a NADPH oxidase, causando prejuízo da função celular e até mesmo morte da célula (LIU et al., 2014).

No presente trabalho foi observada maior lipoperoxidação no tecido cardíaco pelo método de TBARS no grupo D em relação ao grupo C. A técnica TBARS quantifica malondialdeídos no tecido que é um metabólito da quebra por oxidação de lipídios, reação de oxidação que depende da presença de metais de transição para ocorrer(SILVA et al., 2011). Esse dano oxidativo foi revertido no grupo DTI, os quais apresentaram também normalização da glicemia com o tratamento insulínico.

Outra técnica utilizada para verificar oxidação lipídica é a quimiluminescência (QL), sendo que nessa técnica não foi observada diferença entre os três grupos estudados neste trabalho. O treinamento físico já se mostrou eficiente em reduzir a lipoperoxidação avaliada por QL em ratas diabéticas menopausadas, o que foi associado com melhora de função cardíaca nesses animais (QUINTEIRO et al., 2015). Sabe-se que o treinamento físico leva a uma adaptação da resposta antioxidante, deixando os sujeitos que o praticam regularmente, mais tolerantes ao estresse oxidativo e a lipoperoxidação gerada por ele (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Neste caso, a diminuição de lipoperoxidação atingida com o treinamento físico nas ratas diabéticas por STZ, diferentemente da redução

apresentada pelo tratamento com insulina desta dissertação, ocorre sem haver alteração do estado hiperglicêmico, pois o treinamento físico não altera glicemia neste modelo de diabetes.

Similarmente ao resultado da QL do presente estudo, a oxidação de proteínas quantificada pelas proteínas carboniladas foi igual entre todos os grupos estudados. O fato de se conseguir detectar oxidação somente de lipídios, em semelhança com o estudo de Silva e colaboradores de 2011, sugere que os substratos bioquímicos possuem diferentes suscetibilidades ao estresse produzido por essa doença(SILVA et al., 2011).

Em relação às enzimas antioxidantes avaliadas em tecido cardíaco, a catalase e a glutationa peroxidase apresentaram suas atividades aumentadas no grupo diabético em comparação ao grupo controle. Esse resultado vai de acordo com outro trabalho recente que foi o primeiro a mostrar um aumento significativo da atividade dessas duas enzimas antioxidantes (CAT e GPx) em VE de ratos diabéticos por STZ após 30 dias de protocolo (MALFITANO; BARBOZA; et al., 2014). Sugere-se que esse aumento das defesas antioxidantes ocorra como uma adaptação ao maior estímulo oxidativo nesses animais e mesmo com maior atividade dessas enzimas antioxidante, ainda assim foi observado maior dano oxidativo aos lipídios nos animais diabéticos.

A catalase é uma enzima que atua especificamente sobre o peróxido de hidrogênio, não atuando sobre peróxidos orgânicos. Já a glutationa peroxidase, atua sobre hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos causando a redução deles através da sua ligação na glutationa reduzida, resultando em glutationa oxidada e água ou álcoois. O peróxido de hidrogênio é considerado uma espécie reativa de oxigênio não radicalar, é um intermediário que é formado principalmente através da dismutação do radical ânion superóxido catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (VASCONCELOS et al., 2007). O peróxido de hidrogênio pode se difundir rapidamente pelas células e em presença de metais de transição dá origem ao radical hidroxila (BARREIROS et al., 2006). A alta atividade das enzimas que envolvem a detoxificação de hidroperóxidos nas células do VE sugere que existe um aumento dessa ERO no tecido cardíaco dos animais diabéticos.

Pode-se ainda considerar o fato do peróxido de hidrogênio ser resultado da dismutação do radical ânion superóxido, que é um radical que já foi mostrado que sua produção aumentada pela mitocôndria é relacionada a mecanismos envolvidos no início da patogênese das complicações do diabetes (BROWNLEE, 2001, 2005). Sendo que o

aumento de peróxido de hidrogênio pode estar ocorrendo por uma tentativa dessas células em neutralizar o radical ânion superóxido e impedir sua ação danosa.

Já foi mostrado na literatura que mitocôndrias isoladas de cardiomiócitos de cobaias diabéticas por STZ apresentam menor produção de peróxido de hidrogênio, o que não foi seguido de aumento de expressão de enzimas antioxidantes no citoplasma nem na mitocôndria (TOCCHETTI et al., 2015). No entanto, esse trabalho avaliou a expressão das enzimas e não a atividade; portanto, poderia estar havendo um aumento da atividade dessas enzimas, como mostrado por nossos dados. Nesse trabalho de Tocchetti e colaboradores de 2015, a mitocôndria de animais diabéticos tratados com insulina apresentaram menor produção de peróxido de hidrogênio também, o que foi relacionado com o fato da insulina conseguir restaurar para os valores basais a produção de NADH/NADPH (TOCCHETTI et al., 2015).

Existem algumas evidências que tentam explicar o mecanismo pelo qual ocorre essa resposta de adaptação das células dos animais diabéticos que leva a aumento da defesa antioxidante. Um estudo de Grootaert e colaboradores de 2015 mostrou em camundongos com deleção de um gene essencial para autofagia nas células da musculatura lisa vascular (que desenvolve aterosclerose com o tempo) que o defeito do processo de autofagia leva a uma indução do aumento da defesa antioxidante nessas células. Também foi mostrado que o defeito no processo de autofagia desencadeava a uma hipertrofia, aumento de depósito de colágeno e de migração de células imunes (GROOTAERT et al., 2015). Deve-se salientar que a autofagia é um processo muito importante para retirar células prejudicadas e sustentar o processo de vida celular. Existem trabalhos na literatura mostrando que de fato o processo de autofagia no coração de modelos experimentais de diabetes tipo 1 está diminuído, assim como que a ativação desse mecanismo traz efeitos benéficos a função cardíaca desses animais (HE et al., 2013 e XU, X. et al., 2013).

Em contrapartida aos resultados obtidos no grupo D, os dados dessa dissertação mostraram que o tratamento com insulina foi capaz de restabelecer o estado de estresse oxidativo no grupo DTI. O grupo de ratos diabéticos tratados com insulina, além de ter normalizado o dano oxidativo a lipídios, tiveram uma normalização da atividade de ambas as enzimas antioxidantes estudadas, CAT e GPx, sugerindo que não necessitavam deste condicionamento positivo das defesas antioxidantes.

No presente trabalho foi quantificada também a razão entre glutationa reduzida e oxidada no VE. A glutationa é um tripeptídeo que pode atuar sequestrando radicais hidroxila e oxigênio singletos antes que eles façam algum dano ao tecido, possuindo desta forma ação antioxidant não enzimática (GIOIELLI, 2006; VASCONCELOS et al., 2007). O grupo D apresentou aumento na quantidade de glutationa tanto em sua forma oxidada quanto reduzida e consequentemente estava aumentada a glutationa total neste grupo. No entanto, quanto à medida da razão entre glutationa reduzida pela oxidada, não houve diferença entre os grupos, sugerindo que o grupo diabético apesar de ter maior quantidade de glutationa oxidada, por possivelmente aumento de EROs, também tinha maior quantidade de glutationa reduzida, conseguindo ainda manter um balanço redox final em equilíbrio. Adicionalmente, o grupo de ratos diabéticos tratados com insulina obteve normalização destes parâmetros de estresse oxidativo relacionados à glutationa, não sendo observadas diferenças na glutationa reduzida e oxidada em relação ao grupo controle.

Novamente no estudo de Tocchetti e colaboradores de 2015, foi avaliada também a emissão de EROs, mais especificamente peróxido de hidrogênio, pela mitocôndria de cardiomiócitos de cobaias diabéticas por STZ e cobaias diabéticas tratadas com insulina. A quantidade de EROs foi igual entre os dois grupos, no entanto, quando esses corações foram expostos a estímulos estressantes como alta quantidade de glicose e betaadrenégico (isoproterenol), a emissão de EROs aumentou no grupo diabético; aumento que não ocorreu no grupo tratado com insulina, mostrando em acordo com os dados desta dissertação, os efeitos do tratamento com insulina em normalizar o balanço redox (TOCCHETTI et al., 2015). Dessa forma, os nossos resultados mostrando normalização de parâmetros de estresse oxidativo no grupo DTI nos levam a concluir que o tratamento com insulina, com consequente normalização da glicemia, causa um efeito benéfico sobre o balanço redox, o que provavelmente tem um papel positivo na atenuação das disfunções cardíacas e hemodinâmicas associadas com este modelo experimental de diabetes.

A capacidade antioxidant total é uma técnica que quantifica antioxidantes não enzimáticos, a glutationa faz parte deste grupo, assim como outros compostos produzidos pelo organismo, a exemplo a ubiquinona e o ácido úrico. Em conjunto a eles, compostos obtidos na dieta como vitamina E, C, beta-caroteno, entre outros também participam da defesa antioxidant não enzimática nos tecidos (VASCONCELOS et al., 2007). Essa

medida foi aumentada no grupo D, permanecendo aumentada no grupo DTI. O aumento da TRAP nos ratos diabéticos corrobora com o aumento de glutationa total, podendo envolver ainda acúmulo de outros antioxidantes não enzimáticos como parte do condicionamento do sistema de defesa antioxidant do coração observado na situação de hiperglicemia no diabetes. Já no grupo DTI, esse aumento na TRAP pode estar relacionado com a atividade antioxidant já documentada da insulina(MONNIER et al., 2013).

O fato do tratamento com insulina normalizar todos os parâmetros pesquisados de estresse oxidativo no tecido cardíaco, com exceção da TRAP, indica que outros estudos necessitam ser feitos para se entender a relação do estresse oxidativo com a disfunção diastólica, prejuízo barorreflexo e variabilidade da PAS que permanecem nesse modelo de diabetes mesmo após normalização da glicemia. Deve-se considerar a possibilidade de que ainda assim, ERONs e dano oxidativo a nível não pesquisado, podem estar relacionados com essas disfunções remanescentes.

Considerando que a hiperglicemia crônica observada no diabetes leva aumento de estresse oxidativo com impacto negativo sobre o endotélio da microvasculatura dos diversos órgãos desencadeando complicações (DE HAAN; COOPER, 2011), como a nefropatia diabética, que é uma das principais causas de mortalidade entre os pacientes com DM tipo 1 (BJORNSTAD et al., 2014), no presente estudo buscamos avaliar o estresse oxidativo em tecido renal. Adicionalmente, deve-se considerar o papel fundamental dos rins no controle da pressão arterial (IRIGOYEN et al., 2005).

A taxa de glicose que atravessa os glomérulos por dia é cerca de 180 gramas, considerando uma pessoa normoglicêmica, com concentração de glicose no plasma entre 80 e 120 mg/dL. Sabe-se que existe uma relação linear da carga de glicose no filtrado renal e de glicose no plasma, sendo assim em condições de hiperglicemia, a quantidade de glicose filtrada diariamente pelo rim aumenta respectivamente (CERSOSIMO et al., 2014). Com o tempo ocorre a instalação de um quadro de microalbuminúria e macroalbuminúria que evolui causando diminuição da taxa de filtração glomerular por perda de néfrons (GOEL; PERKINS, 2012).

Shah e colaboradores já mostraram em uma revisão aumento de produção de EROS e estresse oxidativo em diversos modelos de doença renal crônica (SHAH, 2004). Adicionalmente, estudos mostram aumento da produção de superóxido e de

peróxido de hidrogênio em glomérulos isolados de ratos diabéticos (CHEN et al., 2000; KOYA et al., 2003). Acredita-se que as principais fontes de produção aumentada de EROS em modelos de nefropatia diabética é através de enzimas como a NOX4 ou a óxido nítrico sintase (NOS) desacoplada, sendo que o aumento da expressão de NOX4, assim como de desacoplamento de NOS já foi observado em tecido renal de ratos diabéticos (RUIZ et al., 2013). A diminuição de estresse oxidativo renal, que pode ser induzida por ativação de fator nuclear (derivado de eritroide-2) tipo 2 (Nrf2), como por exemplo com o uso de um fraco ativador desse fator de transcrição chamado sulforafano, leva a características renoprotetoras e se mostrou capaz de atenuar a nefropatia diabética em modelo de diabetes em ratos por STZ(RUIZ et al., 2013). A diminuição de estresse oxidativo através de treinamento físico também já se mostrou capaz de melhorar função renal em modelo de camundongos diabéticos tipo 2 (ISHIKAWA et al., 2012), assim como o treinamento físico em ratos diabéticos por STZ com sua ação benéfica conhecida sobre o estresse oxidativo, levou a uma atenuação do aumento de excreção de TBARS e da diminuição de eliminação de creatinina e ureia nesses animais, melhorando função renal (RODRIGUES et al., 2011).

Neste presente estudo, observou-se no grupo de animais diabéticos aumento de lipoperoxidação em tecido renal quando medida tanto pela técnica de QL quanto pela técnica de TBARS. De forma semelhante também houve maior oxidação de proteínas medida por quantidade de carbonilas nesse tecido. É interessante notar que esse aumento na oxidação do tecido renal nos animais diabéticos ocorreu mesmo com a resposta adaptativa de aumento das defesas antioxidantes, semelhante a observada em tecido cardíaco, na qual foi evidenciada aumento da atividade da enzima antioxidante GPx. Tal resposta adaptativa pode ser interpretada como um possível mecanismo protetor para o estado de aumento de estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia crônica observada neste modelo experimental de diabetes. Todavia, não observamos diferença na capacidade antioxidante total (TRAP) no rim entre os três grupos.

No estudo de Palma e colaboradores de 2013, o tratamento com insulina também foi capaz restaurar os valores aumentados de TBARS no grupo diabético avaliado em tecido renal, hepático e no plasma (PALMA et al., 2014). Concluímos assim, a partir dos resultados do presente trabalho, que o tratamento com insulina normalizou não só o dano oxidativo ao tecido renal, mas também igualou ao grupo controle a atividade da GPx. Sabendo que o estresse oxidativo possui um importante papel no desenvolvimento das

complicações devido ao diabetes e a hiperglicemia, a melhora da função renal avaliada na gaiola metabólica observada pela normalização no volume urinário, bem como a normalização da PA dos ratos do grupo DTI, podem estar associadas com a melhora no estado de estresse oxidativo dos animais diabéticos tratados com insulina.

## 6. CONCLUSÃO

Nossos achados confirmam disfunção metabólica, cardiovascular e autonômica, além de alteração em tecido renal, em ratos diabéticos por STZ. Além disto, o tratamento com insulina NPH por 30 dias em ratos diabéticos foi capaz de normalizar a glicemia, a massa corporal e o volume urinário, a PA e a FC, a morfometria e a função sistólica cardíaca, o controle autonômico cardíaco, a variabilidade da frequência cardíaca e estresse oxidativo em tecido cardíaco e renal.

Todavia, o resultado mais importante observado neste trabalho, foi que o tratamento com insulina não foi capaz de reverter a disfunção diastólica, do barorreflexo e da variância da PAS, sugerindo um risco cardiovascular remanescente mesmo após a obtenção de um bom controle glicêmico neste modelo experimental de diabetes tipo 1.

Os nossos dados alertam para a importância de se monitorar outras variáveis além da PA e FC para avaliação do cardiovascular de portadores de diabetes tipo 1, como a sensibilidade barorreflexa, a variabilidade da PA e o ecocardiograma, que podem ser realizadas clinicamente, oferecendo informações mais precisas sobre o risco cardiovascular e possíveis complicações associadas ao diabetes. É importante ainda destacar que nossos resultados reforçam a necessidade da busca de outras terapias para serem utilizadas em associação com o tratamento com insulina no manejo do risco cardiovascular em portadores de diabetes tipo 1. Tal afirmação baseia-se no fato de que independentemente de se atingir um bom controle glicêmico e normalização de vários parâmetros cardiovasculares e renais, a disfunção autonômica e diastólica cardíaca permanecem mesmo com a reposição de insulina em modelo experimental de diabetes, sugerindo que tais disfunções estejam relacionadas a maior mortalidade observada em diabéticos tipo 1.

## 7. REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, V.; UCHIDA, T.; YENUSH, L.; DAVIS, R.; WHITE, M. F. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 12, p. 9047–9054, 2000.
- ANDERSON, E. A.; HOFFMAN, R. P.; BALON, T. W.; SINKEY, C. A.; MARK, A. L. Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 6, p. 2246–2252, 1991.
- ARAÚJO, L. M. B.; BRITTO, M. M. DOS S.; CRUZ, P. DA; R, T. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 44, n. 6, p. 509–518, 2000.
- ARMUTCU, F.; COSKUN, O.; GÜREL, A.; et al. Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 540–547, 2005.
- ASTON-MOURNEY, K.; PROIETTO, J.; MORAHAN, G.; ANDRIKOPOULOS, S. Too much of a good thing: why it is bad to stimulate the beta cell to secrete insulin. **Diabetologia**, v. 51, n. 4, p. 540–545, 2008.
- BALKAU, B.; HOME, P. D.; VINCENT, M.; MARRE, M.; FREEMANTLE, N. Factors associated with weight gain in people with type 2 diabetes starting on insulin. **Diabetes Care**, v. 37, n. 8, p. 2108–2113, 2014.
- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. E. The role of advanced glycation endproducts (AGEs) in the development of vascular diabetic complications. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 940–950, 2008.
- BARREIROS, A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.
- BARRETO, S. M.; PASSOS, V. M. A.; ALMEIDA, S. K. F.; ASSIS, T. D. The increase of diabetes mortality burden among Brazilian adults. **Revista Panamericana De Salud Pública/Pan American Journal of Public Health**, v. 22, n. 4, p. 239–245, 2007.
- BATES, A.; SHEN, Q.; HIEBERT, J. B.; THIMMESCH, A.; PIERCE, J. D. Myocardial energetics and ubiquinol in diastolic heart failure. **Nursing & Health Sciences**, v. 16, n. 4, p. 428–433, 2014.

BELL, D. S. H. Insulin therapy in diabetes mellitus: how can the currently available injectable insulins be most prudently and efficaciously utilised? **Drugs**, v. 67, n. 13, p. 1813–1827, 2007.

BELLÓ-KLEIN, A.; BOCK, P. M.; TRAVACIO, M.; SENNA, S. M.; LLESUY, S.; DE BITTENOURT, P. I.; IRIGOYEN, M. C.; BELLÓ, A. A.; KUMAR, D.; SINGAL, P. K.

Myocardial oxidative stress and antioxidants in hypertension as a result of nitric oxide synthase inhibition. **Cardiovascular Toxicology**, v. 1, n. 1, p. 43–50, 2001.

BERRY, C.; BROSNAN, M. J.; FENNELL, J.; HAMILTON, C. A.; DOMINICZAK, A. F. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 10, n. 2, p. 247–255, 2001.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882–888, 1963.

BIGGER, J. T.; FLEISS, J. L.; STEINMAN, R. C.; ROLNITZKY, L. M.; KLEIGER, R. E.; ROTTMAN, J. N. Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction. **Circulation**, v. 85, n. 1, p. 164–171, 1992.

BJORNSTAD, P.; CHERNEY, D.; MAAHS, D. M. Early diabetic nephropathy in type 1 diabetes: new insights. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity**, v. 21, n. 4, p. 279–286, 2014.

BLANTZ, R. C.; TUCKER, B. J.; GUSHWA, L.; PETERSON, O. W. Mechanism of diuresis following acute modest hyperglycemia in the rat. **The American Journal of Physiology**, v. 244, n. 2, p. F185–194, 1983.

BOSSENMAIER, B.; STRACK, V.; STOYANOV, B.; KRUTZFELDT, J.; BECK, A.; LEHMANN, R.; KELLERER, M.; KLEIN, H.; ULLRICH, A.; LAMMERS, R.; HARING, H. U. Serine residues 1177/78/82 of the insulin receptor are required for substrate phosphorylation but not autophosphorylation. **Diabetes**, v. 49, n. 6, p. 889–895, 2000.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **The Biochemical Journal**, v. 134, n. 3, p. 707–716, 1973.

BRANDS, M. W.; CLOUD, L. J. Control of arterial pressure by angiotensin II and nitric oxide at the onset of diabetes. **American Journal of Hypertension**, v. 16, n. 7, p. 600–603, 2003.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813–820, 2001.

- BROWNLEE, M. The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615–1625, 2005.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302–310, 1978.
- CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation Research**, v. 87, n. 10, p. 840–844, 2000.
- CAMERON, N. E.; COTTER, M. A.; LOW, P. A. Nerve blood flow in early experimental diabetes in rats: relation to conduction deficits. **The American Journal of Physiology**, v. 261, n. 1 Pt 1, p. E1–8, 1991.
- CAMPANUCCI, V.; KRISHNASWAMY, A.; COOPER, E. Diabetes depresses synaptic transmission in sympathetic ganglia by inactivating nAChRs through a conserved intracellular cysteine residue. **Neuron**, v. 66, n. 6, p. 827–834, 2010.
- CARROLL, S. L.; BYER, S. J.; DORSEY, D. A.; WATSON, M. A.; SCHMIDT, R. E. Ganglionspecific patterns of diabetes-modulated gene expression are established in prevertebral and paravertebral sympathetic ganglia prior to the development of neuroaxonal dystrophy. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 63, n. 11, p. 1144–1154, 2004.
- CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419–425, 2002.
- CERSOSIMO, E.; SOLIS-HERRERA, C.; TRIPLITT, C. Inhibition of renal glucose reabsorption as a novel treatment for diabetes patients. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 1, p. 80–92, 2014.
- CHANG, K. S.; LUND, D. D. Alterations in the baroreceptor reflex control of heart rate in streptozotocin diabetic rats. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 18, n. 6, p. 617–624, 1986.
- CHEN, H. C.; GUH, J. Y.; SHIN, S. J.; TSAI, J. H.; LAI, Y. H. Reactive oxygen species enhances endothelin-1 production of diabetic rat glomeruli in vitro and in vivo. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 135, n. 4, p. 309–315, 2000.
- CHEN, Y.-W.; CHIU, C.-C.; HSIEH, P.-L.; HUNG, C.-H.; WANG, J.-J. Treadmill training combined with insulin suppresses diabetic nerve pain and cytokines in rat sciatic nerve. **Anesthesia and Analgesia**, v. 121, n. 1, p. 239–246, 2015.

CVETKOVIC, I.; AL-ABED, Y.; MILJKOVIC, D.; MAKSIMOVIC-IVANIC, D.; ROTH, J.; BACHER, M.; LAN, H. Y.; NICOLETTI, F. STOSIC-GRUJICIC, S. Critical role of macrophage migration inhibitory factor activity in experimental autoimmune diabetes. **Endocrinology**, v. 146, n. 7, p. 2942–2951, 2005.

DALL'AGO, P.; FERNANDES, T. G.; MACHADO, U. F.; BELLÓ, A. A.; IRIGOYEN, M. C. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 1, p. 119–124, 1997.

DALL'AGO, P.; SILVA, V. O. K.; DE ANGELIS, K. L. D.; IRIGOYEN, M.; FAZAN, R. SALGADO, H. C. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 7, p. 843–849, 2002.

DANTAS, A. P. V.; CARVALHO, M. H. C. DE. Efecto protector de los estrogenos en el sistema cardiovascular. **Antioxidantes y Calidad de Vida**, v. 7, n. 28, p. 6–11, 2000.

DAVID-SILVA, A.; FREITAS, H. S.; OKAMOTO, M. M.; SABINO-SILVA, R.; SCHAAAN, B. D.; MACHADO, U. F. Hepatocyte nuclear factors 1 $\alpha$ /4 $\alpha$  and forkhead box A2 regulate the solute carrier 2A2 (Slc2a2) gene expression in the liver and kidney of diabetic rats. **Life Sciences**, v. 93, n. 22, p. 805–813, 2013.

DE ANGELIS, K.; D'AGORD SCHAAAN, B.; RODRIGUES, B.; MALFITANO, C.; IRIGOYEN, M. C. Cardiovascular autonomic dysfunction in experimental diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, n. 2, p. 185–194, 2007.

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

DE ANGELIS, K. L.; CESTARI, I. A.; BARP, J.; DALL'AGO, P.; FERNANDES, T. G.; DE BITTENCOURT, P. I.; BELLÓ-KLEIN, A.; BELLÓ, A. A.; LLESUY, S.; IRIGOYEN, M. C.

Oxidative stress in the latissimus dorsi muscle of diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 11, p. 1363–1368, 2000.

DE ANGELIS, K. L.; OLIVEIRA, A. R.; DALL'AGO, P.; PEIXOTO, L. R.; GADNSKI, G.; LACCHINI, S.; FERNANDES, T. G.; IRIGOYEN, M. C. Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 6, p. 635–641, 2000.

DE ANGELIS, K.; PUREZA, D. Y. DA; FLORES, L. J. F.; RODRIGUES, B. MELO, K. F. S.; SCHAAAN, B. D.; IRIGOYEN, M. C. Efeitos fisiológicos do treinamento físico em pacientes portadores de diabetes tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 6, p. 1005–1013, 2006.

DE ANGELIS, K.; SCHAAAN, B. D.; MAEDA, C. Y.; DALL'AGO, P.; WICHI, R. B. IRIGOYEN, M. C. Cardiovascular control in experimental diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 9, p. 1091–1100, 2002.

DEBLIEUX, P. M.; BARBEE, R. W.; McDONOUGH, K. H.; SHEPHERD, R. E. Exercise training improves cardiac performance in diabetic rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 203, n. 2, p. 209–213, 1993.

DECKER, R. S.; COOK, M. G.; BEHNKE-BARCLAY, M.; DECKER, M. L. Some growth factors stimulate cultured adult rabbit ventricular myocyte hypertrophy in the absence of mechanical loading. **Circulation Research**, v. 77, n. 3, p. 544–555, 1995.

DESMANGLES, J.-C. Treatment of type 1 diabetes in children and adolescents. **Drug Development Research**, v. 69, n. 3, p. 158–164, 2008.

DEVEREUX, R. B.; REICHEK, N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. **Circulation**, v. 55, n. 4, p. 613–618, 1977.

DHALLA, N. S.; TAKEDA, N.; RODRIGUEZ-LEYVA, D.; ELIMBAN, V. Mechanisms of subcellular remodeling in heart failure due to diabetes. **Heart Failure Reviews**, v. 19, n. 1, p. 87–99, 2014.

EL-OSTA, A.; BRASACCHIO, D.; YAO, D.; POCAI, A.; JONES, P. L.; ROEDER, R. G.; COOPER, M. E.; BROWNLEE, M. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 10, p. 2409–2417, 2008.

FACCHINI, F. S.; STOOHS, R. A.; REAVEN, G. M. Enhanced sympathetic nervous system activity. The linchpin between insulin resistance, hyperinsulinemia, and heart rate. **American Journal of Hypertension**, v. 9, n. 10 Pt 1, p. 1013–1017, 1996.

FAZAN, R.; BALLEJO, G.; SALGADO, M. C.; MORAES, M. F.; SALGADO, H. C. Heart rate variability and baroreceptor function in chronic diabetic rats. **Hypertension**, v. 30, n. 3 Pt 2, p. 632–635, 1997.

FERREIRA, S. R. G.; CESARINI, P. R.; VIVOLO, M. A.; ZANELLA, M. T. Abnormal nocturnal blood pressure fall in normotensive adolescents with insulin-dependent diabetes is ameliorated following glycemic improvement. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 4, p. 523–528, 1998.

FLEISCHER, J. Diabetic autonomic imbalance and glycemic variability. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 6, n. 5, p. 1207–1215, 2012.

FLEISCHER, J.; LEBECH CICHOSZ, S.; HOEYEM, P.; LAUGESEN, E.; LOEGSTRUP POULSEN, P.; SANDAHL CHRISTIANSEN, J.; TARNOW, L. HANSEN, T. K. Glycemic variability is associated with reduced cardiac autonomic modulation in women with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 38, n. 4, p. 682–688, 2015.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 114–121, 1984.

FLOREZ, H.; CASTILLO-FLOREZ, S.; MENDEZ, A.; CASANOVA-ROMERO, P.; LARREAL-URDANETA, C.; LEE, D.; GOLDBERG, R. C-reactive protein is elevated in obese patients with the metabolic syndrome. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 71, n. 1, p. 92–100, 2006.

FOPPA, M.; DUNCAN, B. B.; ROHDE, L. E. Echocardiography-based left ventricular mass estimation. How should we define hypertrophy? **Cardiovascular Ultrasound**, v. 3, p. 17, 2005.

FRATTOLA, A.; PARATI, G.; GAMBA, P.; PALEARI, F.; MAURI, G.; DI RIENZO, M.; CASTIGLIONI, P.; MANCIA, G. Time and frequency domain estimates of spontaneous baroreflex sensitivity provide early detection of autonomic dysfunction in diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 40, n. 12, p. 1470–1475, 1997.

FREITAS, S. C. F.; HARTHMANN, Â. D'AVILA; RODRIGUES, B.; IRIGOYEN, M.-C.; DE ANGELIS, K. Effect of aerobic exercise training on regional blood flow and vascular resistance in diabetic rats. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 7, p. 115, 2015.

FULLERTON, B.; JEITLER, K.; SEITZ, M.; HORVATH, K.; BERGHOLD, A.; SIEBENHOFER, A. Intensive glucose control versus conventional glucose control for type 1 diabetes mellitus. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2, p. CD009122, 2014.

GELLING, R. W.; OVERDUIN, J.; MORRISON, C. D.; MORTON, G. J.; FRAYO, R. S.; CUMMINGS, D. E.; SCHWARTZ, M. W. Effect of uncontrolled diabetes on plasma ghrelin concentrations and ghrelin-induced feeding. **Endocrinology**, v. 145, n. 10, p. 4575–4582, 2004.

GIOIELLI, L. A. Nutrição: fundamentos e aspectos atuais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 149–149, 2006.

GLUSHAKOVA, O.; KOSUGI, T.; RONCAL, C.; MU, W.; HEINING, M.; CIRILLO, P.; SANCHEZ-LOZADA, L. G.; JOHNSON, R. J.; NAKAGAWA, T. Fructose induces the inflammatory molecule ICAM-1 in endothelial cells. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 19, n. 9, p. 1712–1720, 2008.

GOEL, G.; PERKINS, B. A. Can improved glycemic control slow renal function decline at all stages of diabetic nephropathy? **Seminars in Nephrology**, v. 32, n. 5, p. 423–431, 2012.

GÓMEZ-PÉREZ, F. J.; RULL, J. A. Insulin therapy: current alternatives. **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 3, p. 258–272, 2005.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 10, n. 2, p. 93–100, 1991.

GROOTAERT, M. O.; DA COSTA MARTINS, P. A.; BITSCH, N.; PINTELON, I.; DE MEYER, G. R.; MARTINET, W.; CHRIJVERS, D. M. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells accelerates senescence and promotes neointima formation and atherosclerosis. **Autophagy**, v. 11, n. 11, p. 2014–2032, 2015.

GU, H.; XIA, X.; CHEN, Z.; LIANG, H.; YAN, J.; XU, F.; WENG, J. Insulin therapy improves islet functions by restoring pancreatic vasculature in high-fat diet-fed streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Diabetes**, v. 6, n. 3, p. 228–236, 2014.

DE HAAN, J. B.; COOPER, M. E. Targeted antioxidant therapies in hyperglycemia-mediated endothelial dysfunction. **Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)**, v. 3, p. 709–729, 2011.

HART, G. W.; AKIMOTO, Y. The O-GlcNAc Modification. In: A. Varki; R. D. Cummings; J. D. Esko; et al. (Eds.); **Essentials of Glycobiology**. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. Retrieved February 5, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1954/>, 2009.

HARTHMANN, A. D.; DE ANGELIS, K.; COSTA, L. P.; SENADOR, D.; SCHAAAN, B. D.; KRIEGER, E. M.; IRIGOYEN, M. C. Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 133, n. 2, p. 115–120, 2007.

HE, C.; ZHU, H.; LI, H.; ZOU, M.-H.; XIE, Z. Dissociation of Bcl-2-Beclin1 complex by activated AMPK enhances cardiac autophagy and protects against cardiomyocyte apoptosis in diabetes. **Diabetes**, v. 62, n. 4, p. 1270–1281, 2013.

HREIDARSSON, A. B. Acute, reversible autonomic nervous system abnormalities in juvenile insulin-dependent diabetes. A pupillographic study. **Diabetologia**, v. 20, n. 4, p. 475–481, 1981.

HUNG, J.; MCQUILLAN, B. M.; CHAPMAN, C. M. L.; THOMPSON, P. L.; BEILBY, J. P. Elevated interleukin-18 levels are associated with the metabolic syndrome independent of obesity and insulin resistance. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 6, p. 1268–1273, 2005.

Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. **Lancet (London, England)**, v. 352, n. 9131, p. 837–853, 1998.

IRIGOYEN, M.-C.; PAULINI, J.; FLORES, L. J. F.; FLUES, K.; BERTAGNOLLI, M.; MOREIRA, E. D.; CONSOLIM-COLOMBO, F.; BELLÓ-KLEIN, A.; DE ANGELIS, K. Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 998–1003, 2005.

ISHIKAWA, Y.; GOHDA, T.; TANIMOTO, M.; OMOTE, K.; FURUKAWA, M.; YAMAGUCHI, S.; MURAKOSHI, M.; HAGIWARA, S.; HORIKOSHI, S.; FUNABIKI, K., TOMINO, Y. Effect of exercise on kidney function, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetic KK-A(y) mice. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p. 702948, 2012.

ISHISE, H.; ASANOI, H.; ISHIZAKA, S.; JOHO, S.; KAMEYAMA, T.; UMENO, K.; INOUE, H. Time course of sympathovagal imbalance and left ventricular dysfunction in conscious dogs with heart failure. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 84, n. 4, p. 1234–1241, 1998.

JACKSON, C. V.; CARRIER, G. O. Influence of short-term experimental diabetes on blood pressure and heart rate in response to norepinephrine and angiotensin II in the conscious rat. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 260–265, 1983.

JAGASIA, D.; MCNULTY, P. H. Diabetes mellitus and heart failure. **Congestive Heart Failure (Greenwich, Conn.)**, v. 9, n. 3, p. 133–139; quiz 140–141, 2003.

JANSZKY, I.; ERICSON, M.; LEKANDER, M.; BLOM, M.; BUHLIN, K.; GEORGIADES, A.; AHNVE, S. Inflammatory markers and heart rate variability in women with coronary heart disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 256, n. 5, p. 421–428, 2004.

JEONG, E.-M.; DUDLEY, S. C. Diastolic dysfunction. **Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society**, v. 79, n. 3, p. 470–477, 2015.

JOOST, H. G.; THORENS, B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). **Molecular Membrane Biology**, v. 18, n. 4, p. 247–256, 2001.

JORGE, L.; PUREZA, D. Y. DA; DIAS, D. DA S.; CONTI, F. F.; IRIGOYEN, M. C.; DE ANGELIS, K. Dynamic Aerobic Exercise Induces Baroreflex Improvement in Diabetic Rats, Dynamic Aerobic Exercise Induces Baroreflex Improvement in Diabetic Rats. **Journal of Diabetes Research, Journal of Diabetes Research**, v. 2012, 2012, p. e108680, 2011.

JUNOD, A.; LAMBERT, A. E.; STAUFFACHER, W.; RENOLD, A. E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 11, p. 2129–2139, 1969.

KÄHLER, P.; GREVSTAD, B.; ALMDAL, T.; GLUUD, C.; WETTERSLEV, J.; LUND, S. S.; VAAG, A.; HEMMINGSEN, B. Targeting intensive versus conventional glycaemic control for type 1 diabetes mellitus: a systematic review with meta-analyses and trial sequential analyses of randomised clinical trials. **BMJ Open**, v. 4, n. 8, p. e004806, 2014.

KEEN, H.; TRACK, N. S.; SOWRY, G. S. Arterial pressure in clinically apparent diabetics. **Diabète & Métabolisme**, v. 1, n. 3, p. 159–178, 1975.

KEMPLER, P.; TESFAYE, S.; CHATURVEDI, N.; STEVENS, L. K.; WEBB, D. J.; WATON, S.; KERENYI, Z.; TAMAS, G.; WARD, J. D.; FULLER, J. H.; EURODIAB IDDM Complications Study Group. Autonomic neuropathy is associated with increased cardiovascular risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study. **Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association**, v. 19, n. 11, p. 900–909, 2002.

KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. Global Burden of Diabetes, 1995–2025: Prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**, v. 21, n. 9, p. 1414–1431, 1998.

KOH, K. K.; HAN, S. H.; QUON, M. J. Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 46, n. 11, p. 1978–1985, 2005.

KONRAD, R. J.; MIKOLAENKO, I.; TOLAR, J. F.; LIU, K.; KUDLOW, J. E. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell OGlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. **Biochemical Journal**, v. 356, n. Pt 1, p. 31–41, 2001.

KOYA, D.; HAYASHI, K.; KITADA, M.; KASHIWAGU, A.; KIKKAWA, R.; HANEDA, M. Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 14, n. 8 Suppl 3, p. S250–253, 2003.

KREBS, H. A.; SPEAKE, R. N.; HEMS, R. Acceleration of renal gluconeogenesis by ketone bodies and fatty acids. **Biochemical Journal**, v. 94, n. 3, p. 712–720, 1965.

LA ROVERE, M. T.; BERSANO, C.; GNEMMI, M.; SPECCHIA, G.; SCHWARTZ, P. J. Exercise-induced increase in baroreflex sensitivity predicts improved prognosis after myocardial infarction. **Circulation**, v. 106, n. 8, p. 945–949, 2002.

LA ROVERE, M. T.; BIGGER, J. T.; MARCUS, F. I.; MORTARA, A.; SCHWARTZ, P. J. 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 (London, England)**, v. 351, n. 9101, p. 478–484, 1998.

LECKER, S. H.; SOLOMON, V.; PRICE, S. R.; KWON, Y. T.; MITCH, W. E.; GOLDBERG, A. L. Ubiquitin conjugation by the N-end rule pathway and mRNAs for its components increase in muscles of diabetic rats. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 10, p. 1411–1420, 1999.

LE DOUAIRON LAHAYE, S.; REBILLARD, A.; ZGUIRA, M. S.; MALARDÉ, L.; SAIAG, B.; GRATAS-DELAMARCHE, A.; CARRÉ, F.; BEKONO, F. R. C. Effects of exercise training combined with insulin treatment on cardiac NOS1 signaling pathways in type 1 diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 347, n. 1-2, p. 53–62, 2011.

LEMBO, G.; NAPOLI, R.; CAPALDO, B.; RENDINA, V.; IACCARINO, G.; VOLPE, M.; TRIMARCO, B.; SACCÀ, L. Abnormal sympathetic overactivity evoked by insulin in the skeletal muscle of patients with essential hypertension. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 1, p. 24–29, 1992.

LISSI, E.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 2, p. 153–158, 1995.

LIU, Q.; WANG, S.; CAI, L. Diabetic cardiomyopathy and its mechanisms: Role of oxidative stress and damage. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 5, n. 6, p. 623–634, 2014.

LORELL, B. H.; GROSSMAN, W. **Diastolic Relaxation of the Heart: The Biology of Diastole in Health and Disease**. Springer Science & Business Media, 2012.

MACHADO, U. F. Transportadores de glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 42, n. 6, p. 413–421, 1998.

MAEDA, C. Y.; FERNANDES, T. G.; LULHIER, F.; IRIGOYEN, M. C. Streptozotocin diabetes modifies arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, n. 4, p. 497–501, 1995.

MAEDA, C. Y.; FERNANDES, T. G.; TIMM, H. B.; IRIGOYEN, M. C. Autonomic dysfunction in short-term experimental diabetes. **Hypertension**, v. 26, n. 6 Pt 2, p. 1100–1104, 1995.

MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. **Diabetes Care**, v. 15, n. 11, p. 1509–1516, 1992.

MALFITANO, C.; ALBA LOUREIRO, T. C.; RODRIGUES, B.; SIRVENTE, R.; SALEMI, V. M. C.; RABECHI, N. B.; LACCHINI, S.; CURI, R.; IRIGOYEN, M. C. Hyperglycaemia protects the heart after myocardial infarction: aspects of programmed cell survival and cell death. **European Journal of Heart Failure**, v. 12, n. 7, p. 659–667, 2010.

MALFITANO, C.; BARBOZA, C. A.; MOSTARDA, C.; DE PALMAS, R. K.; DOS SANTOS, C. P.; RODRIGUES, B.; FREITAS, S. C. F.; BELLÓ-KLEIN, A.; LLESUY, S.; IRIGOYEN, M. C.; DE ANGELIS, K. Diabetic hyperglycemia attenuates sympathetic dysfunction and oxidative stress after myocardial infarction in rats. **Cardiovascular Diabetology**, v. 13, p. 131, 2014.

MALFITANO, C.; DE SOUZA JUNIOR, A. L.; CARBONARO, M.; BOLSONI-LOPES, A.; FIGUEROA, D.; DE SOUZA, L. E.; SILVA, K. A. S.; CONSOLIM-COLOMBO, F.; CURI, R.; IRIGOYEN, M. C. Glucose and fatty acid metabolism in infarcted heart from streptozotocininduced diabetic rats after 2 weeks of tissue remodeling. **Cardiovascular Diabetology**, v. 14, p. 149, 2015.

MALFITANO, C.; DE SOUZA JUNIOR, A. L.; IRIGOYEN, M. C. Impact of conditioning hyperglycemic on myocardial infarction rats: Cardiac cell survival factors. **World Journal of Cardiology**, v. 6, n. 6, p. 449–454, 2014.

MARTINS, S. Miocardiopatia diabética: Mecanismos, diagnóstico e terapêutica. , v. 2.

Retrieved March 2, 2016, from <http://www.spc.pt/DL/RFR/artigos/25.pdf>, 2006.

MASER, R. E.; LENHARD, M. J.; KOLM, P.; EDWARDS, D. G. Direct renin inhibition improves parasympathetic function in diabetes. **Diabetes, Obesity & Metabolism**, v. 15, n. 1., 2013.

MASSER, D. R.; VANGUILDER STARKEY, H. D.; BIXLER, G. V.; DUNTON, W.; BRONSON, S. K.; FREEMAN, W. M. Insulin treatment normalizes retinal neuroinflammation but not markers of synapse loss in diabetic rats. **Experimental Eye Research**, v. 125, p. 95–106, 2014.

MCDOWELL, T. S.; CHAPLEAU, M. W.; HAJDUCZOK, G.; ABBOUD, F. M. Baroreflex dysfunction in diabetes mellitus. I. Selective impairment of parasympathetic control of heart rate. **The American Journal of Physiology**, v. 266, n. 1 Pt 2, p. H235–243, 1994.

MCDOWELL, T. S.; HAJDUCZOK, G.; ABBOUD, F. M.; CHAPLEAU, M. W. Baroreflex dysfunction in diabetes mellitus. II. Site of baroreflex impairment in diabetic rabbits. **The American Journal of Physiology**, v. 266, n. 1 Pt 2, p. H244–249, 1994.

MCEVOY, R. C.; ANDERSSON, J.; SANDLER, S.; HELLERSTRÖM, C. Multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in the mouse. Evidence for stimulation of a cytotoxic cellular immune response against an insulin-producing beta cell line. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 74, n. 3, p. 715–722, 1984.

MCNALLY, E. M.; GOLBUS, J. R.; PUCKELWARTZ, M. J. Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 1, p. 19–26, 2013.

MELLING, C. W. J.; GRISÉ, K. N.; HASILO, C. P.; FIER, B.; MILNE, K. J.; KARMAZYN, M.; NOBLE, E. G. A model of poorly controlled type 1 Diabetes Mellitus and its treatment with aerobic exercise training. **Diabetes & Metabolism**, v. 39, n. 3, p. 226–235, 2013.

MILECH, A.; CHACRA, A. R.; KAYATH, M. J. Revisão da hiperglicemia pós-prandial e a hipoglicemias no controle do diabetes mellitus: o papel da insulina lispro e suas pré-misturas nos picos e vales. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 45, n. 5, p. 423–432, 2001.

MIZUNO, T.; MATSUI, H.; IMAMURA, A.; NUMAGUCHI, Y.; SAKAI, K.; MUROHARA, T.; OKUMURA, K. Insulin resistance increases circulating malondialdehyde-modified LDL and

impairs endothelial function in healthy young men. **International Journal of Cardiology**, v. 97, n. 3, p. 455–461, 2004.

MONCKTON, G.; PEHOWICH, E. Autonomic neuropathy in the streptozotocin diabetic rat. **The Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 7, n. 2, p. 135–142, 1980.

MONNIER, L.; HANEFELD, M.; SCHNELL, O.; COLETTE, C.; OWENS, D. Insulin and atherosclerosis: how are they related? **Diabetes & Metabolism**, v. 39, n. 2, p. 111–117, 2013.

MORALES, J. Defining the role of insulin detemir in Basal insulin therapy. **Drugs**, v. 67, n. 17, p. 2557–2584, 2007.

MOSTARDA, C.; ROGOW, A.; SILVA, I. C. M.; DE LA FUENTE, R. N.; JORGE, L.; RODRIGUES, B.; HEEREN, M. V.; CALDINI, E. G.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. C. Benefits of exercise training in diabetic rats persist after three weeks of detraining. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 145, n. 1-2, p. 11–16, 2009.

MOULE, S. K.; DENTON, R. M. Multiple signaling pathways involved in the metabolic effects of insulin. **The American Journal of Cardiology**, v. 80, n. 3A, p. 41A–49A, 1997.

MUIR, A.; SCHATZ, D. A.; MACLAREN, N. K. The pathogenesis, prediction, and prevention of insulin-dependent diabetes mellitus. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 21, n. 2, p. 199–219, 1992.

MURRAY, A.; EWING, D. J.; CAMPBELL, I. W.; NEILSON, J. M.; CLARKE, B. F. RR interval variations in young male diabetics. **British Heart Journal**, v. 37, n. 8, p. 882–885, 1975.

NAKAGAWA, T.; TUTTLE, K. R.; SHORT, R. A.; JOHNSON, R. J. Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. **Nature Clinical Practice. Nephrology**, v. 1, n. 2, p. 80–86, 2005.

NONOGAKI, K. Ghrelin and feedback systems. **Vitamins and Hormones**, v. 77, p. 149–170, 2008.

PAGE, M. M.; WATKINS, P. J. Cardiorespiratory arrest and diabetic autonomic neuropathy. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 8054, p. 14–16, 1978.

PALMA, H. E.; WOLKMER, P.; GALLIO, M.; GALLIO, M.; CORREA, M. M. B.; SCHMATZ, R.; THOME, G. R.; PEREIRA, L. B.; CASTRO, V. S. P.; PEREIRA, A. B.; BUENO, A.; DE OLIVEIRA, L. S.; ROSOLEN, D.; MANN, T. R.; DE CECCO, B. S.; GRAÇA, D. L.; LOPES, S. T. A.; MAZZANTI, C. M. A. Oxidative stress parameters in blood, liver, and kidney of diabetic

rats treated with curcumin and/or insulin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 386, n. 1-2, p. 199–210, 2014.

PAULSON, D. J.; KOPP, S. J.; PEACE, D. G.; TOW, J. P. Improved postischemic recovery of cardiac pump function in exercised trained diabetic rats. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 65, n. 1, p. 187–193, 1988.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 19, n. 6, p. 493–499, 2005.

PAVLOV, V. A.; WANG, H.; CZURA, C. J.; FRIEDMAN, S. G.; TRACEY, K. J. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. **Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 9, n. 5-8, p. 125–134, 2003.

PFEIFER, M. A.; WEINBERG, C. R.; COOK, D. L.; REENAN, A.; HALTER, J. B.; ENSINCK, J. W.; PORTE, D. Autonomic neural dysfunction in recently diagnosed diabetic subjects. **Diabetes Care**, v. 7, n. 5, p. 447–453, 1984.

PIEPER, G. M.; SIEBENEICH, W. Diabetes-induced endothelial dysfunction is prevented by long-term treatment with the modified iron chelator, hydroxyethyl starch conjugateddeferoxamine. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 30, n. 6, p. 734–738, 1997.

PIRART, J. Glycaemic control and prevention of complications. **Minerva Endocrinologica**, v. 9, n. 2, p. 55–58, 1984.

PISCHON, T.; BAMBERGER, C. M.; KRATZSCH, J.; ZYRIAX, B.; ALGENSTAEDT, P.; BOEING, H.; WINDLER, E. Association of plasma resistin levels with coronary heart disease in women. **Obesity Research**, v. 13, n. 10, p. 1764–1771, 2005.

POP-BUSUI, R.; EVANS, G. W.; GERSTEIN, H. C.; FONSECA, V.; GLEG, J. L.; HOOGWERF, B. J.; GENUTH, S.; GRIMM, R. H.; CORSON, M. A.; PRINEAS, R. Effects of cardiac autonomic dysfunction on mortality risk in the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial. **Diabetes Care**, v. 33, n. 7, p. 1578–1584, 2010.

POULEUR, H. Diastolic dysfunction and myocardial energetics. **European Heart Journal**, v. 11 Suppl C, p. 30–34, 1990.

PRADHAN, A. D.; MANSON, J. E.; ROSSOUW, J. E. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women's Health Initiative observational study. **JAMA**, v. 288, n. 8, p. 980–987, 2002.

QI, Q.; WANG, J.; LI, H.; YU, Z.; YE, X.; HU, F.; FRANCO, O. H.; PAN, AN.; LIU, Y.; LIN, X. Associations of resistin with inflammatory and fibrinolytic markers, insulin resistance, and metabolic syndrome in middle-aged and older Chinese. **European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 159, n. 5, p. 585–593, 2008.

QUINTEIRO, H.; BUZIN, M.; CONTI, F. F.; DIAS, D. S.; FIGUEROA, D.; LLESUY, S.; IRIGOYEN, M. C.; SANCHES, I. C.; DE ANGELIS, K. Aerobic exercise training promotes additional cardiac benefits better than resistance exercise training in postmenopausal rats with diabetes. **Menopause (New York, N.Y.)**, v. 22, n. 5, p. 534–541, 2015.

RERUP, C. C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. **Pharmacological Reviews**, v. 22, n. 4, p. 485–518, 1970.

REZENDE, L. F.; SANTOS, G. J.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C. Ciliary neurotrophic factor protects mice against streptozotocin-induced type 1 diabetes through SOCS3: the role of STAT1/STAT3 ratio in  $\beta$ -cell death. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 50, p. 41628–41639, 2012.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 357–363, 1994.

RIDKER, P. M.; HENNEKENS, C. H.; BURING, J. E.; RIFAI, N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 12, p. 836–843, 2000.

RIDKER, P. M.; RIFAI, N.; PFEFFER, M.; SACKS, F.; LEPAGE, S.; BRAUNWALD, E. Elevation of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Increased Risk of Recurrent Coronary Events After Myocardial Infarction. **Circulation**, v. 101, n. 18, p. 2149–2153, 2000.

RIDKER, P. M.; RIFAI, N.; STAMPFER, M. J.; HENNEKENS, C. H. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. **Circulation**, v. 101, n. 15, p. 1767–1772, 2000.

RODRIGUES, A. M.; BERGAMASCHI, C. T.; ARAÚJO, R. C.; MOURO, M. G.; ROSA, T. S.; HIGA, E. M. S. Effects of training and nitric oxide on diabetic nephropathy progression in type I diabetic rats. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, v. 236, n. 10, p. 1180–1187, 2011.

RODRIGUES, B.; MOSTARDA, C. T.; JORGE, L.; BARBOZA, C.; GRANS, C. F.; DE

ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. C. Impact of myocardial infarction on cardiac autonomic function in diabetic rats. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 27, n. 1, p. 16–22, 2013.

RUIZ, S.; PERGOLA, P. E.; ZAGER, R. A.; VAZIRI, N. D. Targeting the Transcription Factor Nrf2 to Ameliorate Oxidative Stress and Inflammation in Chronic Kidney Disease. **Kidney international**, v. 83, n. 6, p. 1029–1041, 2013.

SAHN, D. J.; DEMARIA, A.; KISSLO, J.; WEYMAN, A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. **Circulation**, v. 58, n. 6, p. 1072–1083, 1978.

SANTOS, R. X.; CORREIA, S. C.; ALVES, M. G.; OLIVEIRA, P. F.; CARDOSO, S.; CARVALHO, C.; DUARTE, A. I.; SANTOS, M. S.; MOREIRA, P. I. Insulin therapy modulates mitochondrial dynamics and biogenesis, autophagy and tau protein phosphorylation in the brain of type 1 diabetic rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, n. 7, p. 1154–1166, 2014.

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. Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in streptozotocin-induced diabetic rats treated with insulin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 9, p. 1081–1086, 1997.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308–313, 2004.

SEFEROVIĆ, P. M.; PAULUS, W. J. Clinical diabetic cardiomyopathy: a two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. **European Heart Journal**, v. 36, n. 27, p. 1718–1727, 1727a–1727c, 2015.

SEMRA, Y. K.; WANG, M.; PEAT, N. J.; SMITH, N. C. E.; SHOTTON, H. R.; LINCOLN, J. Selective susceptibility of different populations of sympathetic neurons to diabetic neuropathy in vivo is reflected by increased vulnerability to oxidative stress in vitro. **Neuroscience Letters**, v. 407, n. 3, p. 199–204, 2006.

SENGES, J.; BRACHMANN, J.; PELZER, D.; HASLACHER, C.; WEIHE, E.; KUBLER, W. Altered cardiac automaticity and conduction in experimental diabetes mellitus. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 12, n. 12, p. 1341–1351, 1980.

SHAH, S. V. Oxidants and iron in chronic kidney disease. **Kidney International. Supplement**, n. 91, p. S50–55, 2004.

SILVA, K. A. DOS S.; LUIZ, R. DA S.; RAMPASO, R. R.; DE ABREU, N. P.; MOREIRA, E. D.; MOSTARDA, C. T.; DE ANGELIS, K.; DE PAULO CASTRO TEIXEIRA, V.; IRIGOYEN, M. C.; SCHOR, N. 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.

SILVA, M.; LIMA, W. G. DE; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. [Effect of streptozotocin on the glycemic and lipid profiles and oxidative stress in hamsters]. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 55, n. 1, p. 46–53, 2011.

SÖNMEZ, M. F.; KARABULUT, D.; GUNDUZ, Y.; DUNDAR, M. The Effects of Long-Term Diabetes on Ghrelin Expression in Rat Stomachs. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 24, n. 3, p. 401–407, 2015.

SOUZA, S. B. C.; FLUES, K.; PAULINI, J.; MOSTARDA, C.; RODRIGUES, B.; SOUZA, L. E.; IRIGOYEN, M. C.; DE ANGELIS, K. Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. **Hypertension**, v. 50, n. 4, p. 786–791, 2007.

SPUDICH, J. A. Hypertrophic and dilated cardiomyopathy: four decades of basic research on muscle lead to potential therapeutic approaches to these devastating genetic diseases. **Biophysical Journal**, v. 106, n. 6, p. 1236–1249, 2014.

STAMLER, J.; VACCARO, O.; NEATON, J. D.; WENTWORTH, D.; GROUP, T. M. R. F. I. T. R. Diabetes, Other Risk Factors, and 12-Yr Cardiovascular Mortality for Men Screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. **Diabetes Care**, v. 16, n. 2, p. 434–444, 1993.

STECK, A. K.; KLINGENSMITH, G. J.; FIALLO-SCHARER, R. Recent advances in insulin treatment of children. **Pediatric Diabetes**, v. 8 Suppl 6, p. 49–56, 2007.

STRACK, V.; STOYANOV, B.; BOSSENMAIER, B. Impact of mutations at different serine residues on the tyrosine kinase activity of the insulin receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 239, n. 1, p. 235–239, 1997.

SVAČINOVÁ, H.; SIEGELOVÁ, J.; OLŠOVSKÝ, J. Baroreflex sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus:effect of exercise training. **Scripta Medica**, n. 4. Retrieved February 4, 2016, from <https://is.muni.cz/publication/405207?lang=en>, 2002.

TANG, D.; KANG, R.; LIVESEY, K. M.; et al. High-mobility group box 1 is essential for mitochondrial quality control. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 6, p. 701–711, 2011.

TANG, D.; KANG, R.; ZEH, H. J.; LOTZE, M. T. High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 7, p. 1315–1335, 2011.

THACKERAY, J. T.; DEKEMP, R. A.; BEANLANDS, R. S.; DASILVA, J. N. Insulin restores myocardial presynaptic sympathetic neuronal integrity in insulin-resistant diabetic rats. **Journal of Nuclear Cardiology: Official Publication of the American Society of Nuclear Cardiology**, v. 20, n. 5, p. 845–856, 2013.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502–522, 1969.

TOCCHETTI, C. G.; STANLEY, B. A.; SIVAKUMARAN, V.; BEDJA, D.; O'ROURKE, B. PAOLOCCI, N.; CORTASSA, S.; AON, M. A. Impaired mitochondrial energy supply coupled to increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission under energy/redox stress leads to myocardial dysfunction during Type I diabetes. **Clinical Science (London, England: 1979)**, v. 129, n. 7, p. 561–574, 2015.

TOMLINSON, K. C.; GARDINER, S. M.; HEBDEN, R. A.; BENNETT, T. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. **Pharmacological Reviews**, v. 44, n. 1, p. 103–150, 1992.

TRACEY, K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 2, p. 289–296, 2007.

TSAKIRIDIS, T.; McDOWELL, H. E.; WALKER, T.; DOWNES, C. O.; HUNDAL, H. S.; VRANIC, M. KLIP, A. Multiple roles of phosphatidylinositol 3-kinase in regulation of glucose transport, amino acid transport, and glucose transporters in L6 skeletal muscle cells. **Endocrinology**, v. 136, n. 10, p. 4315–4322, 1995.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. DE F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

VELLOSO, L. A.; CARVALHO, C. R.; ROJAS, F. A.; FOLLI, F.; SAAD, M. J. Insulin signalling in heart involves insulin receptor substrates-1 and -2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK 2-growth related pathway. **Cardiovascular Research**, v. 40, n. 1, p. 96–102, 1998.

VIBERTI, G. C.; KEEN, H.; WISEMAN, M. J. Raised arterial pressure in parents of proteinuric insulin dependent diabetics. **British Medical Journal (Clinical Research Ed.)**, v. 295, n. 6597, p. 515–517, 1987.

VINIK, A. I.; MASER, R. E.; MITCHELL, B. D.; FREEMAN, R. Diabetic autonomic neuropathy. **Diabetes Care**, v. 26, n. 5, p. 1553–1579, 2003.

WANG, H.-J.; KANG, P.-F.; WU, W.-J.; TANG, Y.; PAN, Q. Q.; YE, H. W.; TANG, B.; LI, Z. H.; GAO, Q. Changes in cardiac mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 activity in relation to oxidative stress and inflammatory injury in diabetic rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, n. 2, p. 686–690, 2013.

WICHI, R.; MALFITANO, C.; ROSA, K.; SALEMI, V.; MOSTARDA, C.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. C. Noninvasive and invasive evaluation of cardiac dysfunction in experimental diabetes in rodents. **Cardiovascular Diabetology**, v. 6, p. 14, 2007.

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

XU, J.; LEI, S.; LIU, Y.; GAO, X.; IRWIN, M. G.; XIA, Z. Y.; HEI, Z.; GAN, X.; WANG, T.; XIA, Z. Antioxidant N-Acetylcysteine Attenuates the Reduction of Brg1 Protein Expression in the Myocardium of Type 1 Diabetic Rats, Antioxidant N-Acetylcysteine Attenuates the Reduction of Brg1 Protein Expression in the Myocardium of Type 1 Diabetic Rats. **Journal of Diabetes Research, Journal of Diabetes Research**, v. 2013, 2013, p. e716219, 2013.

XU, L.; BADR, M. Z. Enhanced potential for oxidative stress in hyperinsulinemic rats: imbalance between hepatic peroxisomal hydrogen peroxide production and decomposition due to hyperinsulinemia. **Hormone and Metabolic Research**, v. 31, n. 4, p. 278–282, 1999.

XU, X.; KOBAYASHI, S.; CHEN, K.; TIMM, D.; VOLDEN, P.; HUANG, Y.; GULICK, J.; YUE, Z.; ROBBINS, J.; EPSTEIN, P. N.; LIANG, Q. Diminished autophagy limits cardiac injury in mouse models of type 1 diabetes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 25, p. 18077–18092, 2013.

YAGIHASHI, S.; SIMA, A. A. Diabetic autonomic neuropathy in the BB rat. Ultrastructural and morphometric changes in sympathetic nerves. **Diabetes**, v. 34, n. 6, p. 558–564, 1985.

YAMAGUCHI, Y.; YOSHIKAWA, N.; KAGOTA, S.; NAKAMURA, K.; HAGINAKA, J.; KUNITOMO, M. Elevated circulating levels of markers of oxidative-nitritative stress and

inflammation in a genetic rat model of metabolic syndrome. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 4, p. 380–386, 2006.

YOUNG, R. J.; EWING, D. J.; CLARKE, B. F. Nerve function and metabolic control in teenage diabetics. **Diabetes**, v. 32, n. 2, p. 142–147, 1983.

ZHONG, Y.; AHMED, S.; GRUPP, I. L.; MATLIB, M. A. Altered SR protein expression associated with contractile dysfunction in diabetic rat hearts. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 281, n. 3, p. H1137–1147, 2001.

ZIEGLER, D. Cardiovascular autonomic neuropathy: clinical manifestations and measurement. **Diabetes Reviews**, v. 7, n. 4, p. 342–357, 1999.

## **8. APÊNDICES**

### **8.1. Comitê de Ética**

Protocolo de Pesquisa referente ao Projeto nº AN0011-2014

**Título do Projeto:** Efeito da reposição com insulina nas alterações cardiovasculares e metabólicas induzidas pelo diabetes experimental

Orientador: Kátia De Angelis

Aluno: Sarah Cristina Ferreira Freitas

**Objetivos:** Avaliar o efeito da terapia de reposição insulinica nas alterações cardiovasculares e metabólicas observadas no diabetes experimental por estreptozotocina.

Avaliar em ratos após 30 e 60 dias de acompanhamento os seguintes parâmetros:

- metabólicos: peso corporal, glicemia, e urinários (polidipsia, poliuria, glicosuria, proteinuria e uremia);
- função cardíaca por ecocardiograma (morfométricos, sistólicos e diastólicos);
- cardiovasculares (pressão arterial, PA, e freqüência cardíaca, FC);
- sensibilidade dos pressoreceptores;
- controle autonômico (efeito do simpático e parassimpático);
- modulação Autonômica Cardiovascular (variabilidade da FC e da PA);
- estresse oxidativo no ventrículo esquerdo (lipoperoxidação por quimiluminescência, balanço redox pela razão glutatona oxidada/reduzida, proteínas carboniladas, catalase, glutatona peroxidase, superóxido dismutase e capacidade antioxidante total).

**Métodos:** Para isso, será utilizado ratos wistar machos divididos em três grupos: Grupo C: controle; Grupo D: diabético e Grupo DTI: diabético tratado com insulina. A administração de insulina será ministrada duas vezes ao dia. A glicemia será mensurada nos tempos 30 e 60 dias, nestes tempos também será feita análise bioquímica da urina. Com relação a função cardíaca será feito o registro hemodinâmico e análises de controle autonômico e modulação autonômica. Quanto ao estresse oxidativo serão avaliadas as medidas de lipoperoxidação por quimiluminescência, substâncias reativas do ácido Tiobarbitúrico (TBARS), dosagem de proteínas carboniladas, glutatona total e glutatona oxidada e também será feito análise da atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). Os métodos

estão de acordo.

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

Rattus norvegicus albinus. Raça: Wistar  
biotério da Universidade Nove de Julho  
idade - 10semanas  
peso - 230-260g  
sexo - machos  
24 animais

*Condições de alojamento e nutrição:*

Os animais serão obtidos do Biotério de criação da Universidade Nove de Julho.  
Alimentação: Alimentação ad libitum  
Fonte de água: Água da torneira  
Lotação - Número de animais/area 5 animais  
Exaustão do ar: Não  
Temperatura ambiente 22°C

*Medidas para evitar estresse e/ou dor nos animais:*

Não se aplica

*Procedimento Anestésico e/ou Analgésico (incluir dose e vias de administração):*

Fármaco - Ketamina  
Dose (UI ou mg/kg) 80mg/kg  
Via de administração - intraperitoneal

Fármaco - Xilazina  
Dose (UI ou mg/kg) 12mg/kg  
Via de administração - Intraperitoneal

Fármaco: Buprenorfina  
Dose (UI ou mg/kg) 0,05 a 0,1mg/Kg  
Via de administração - Subcutâneo  
Frequência - A cada 8-12 horas

**Eutanásia:**

Decapitação e as carcaças serão armazenadas em câmara fria, até retirada pela empresa especializada. Método de eutanásia justificado

**Pertinência e valor científico do estudo proposto:**

Este estudo será relevante, pois visa compreender o efeito da terapia de reposição insulínica nas alterações cardiovasculares e metabólicas observadas no diabetes experimental por estreptozotocina.

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

(X) Aprovado, sendo que este projeto deverá permanecer arquivado por 05 (cinco) anos nesta Secretaria.

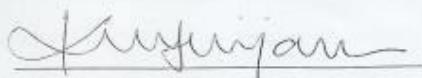
( ) Com pendência (relacionar), devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

( ) Não-Aprovado

Comentário:

- Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEUA-UNINOVE, o relatório final sobre a pesquisa (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

São Paulo, 26 de março de 2014



Prof. Dra. Karin Marie Van Der Heijden Cardenes  
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho

Protocolo de Pesquisa referente ao ADENDO 01 do Projeto nº An0011/2014

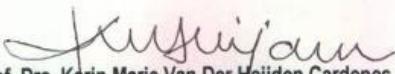
Titulo do Projeto: Efeito da reposição com insulina nas alterações cardiovasculares e metabólicas induzida pelo diabetes experimental. Projeto nº AN0011-2014

Orientador: Kátia De Angelis / Mestranda: Sarah Cristina Ferreira de Freitas

Parecer ao Adendo

A CEUA da UNINOVE em reunião ordinária no dia 18 de março de 2015 **APROVOU o ADENDO 01 do Projeto An0011/2014** que solicitou o uso de **mais 12 (doze) ratos** para a finalização do projeto, considerando a alta mortalidade conforme evidenciado em literatura e no decorrente estudo.

São Paulo, 18 de março de 2015.

  
Prof. Dra. Kárin Marie Van Der Heijden Cardenes  
Vice-Cordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho