

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**Faculdade de Medicina**

**JANAINA PAULINI AGUIAR**

**Influência dos barorreceptores na evolução da  
cardiomiopatia e da nefropatia diabética em ratos**

**São Paulo**

**2011**

**JANAINA PAULINI AGUIAR**

**Influência dos barorreceptores na evolução da  
cardiomiopatia e da nefropatia diabética em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo, para Obtenção do  
Título de Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Claudia Costa  
Irigoyen

**São Paulo**

**2011**

**JANAINA PAULINI AGUIAR**

**Influência dos barorreceptores na evolução da  
cardiomiopatia e da nefropatia diabética em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo, para Obtenção do  
Título de Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Claudia Costa  
Irigoyen

**São Paulo**

**2011**

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Aguiar, Janaina Paulini

Influência dos barorreceptores na evolução da cardiomiopatia e da nefropatia diabética em ratos / Janaina Paulini Aguiar. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cardiologia.

Orientadora: Maria Claudia Costa Irigoyen.

Descritores: 1.Diabetes mellitus 2.Barorreflexo  
3.Cardiomiopatias 4.Nefropatias 5.Fluxo sanguíneo regional  
6.Circulação renal

USP/FM/DBD-054/11

## **Dedicatória**

Dedico esta tese aos meus pais. A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que os trilhasse sem medo e cheio de esperança não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus não bastaria um muitíssimo obrigado. É por vocês que, mesmo sentindo a “presença da ausência”, tenho forças para continuar. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Em gratidão, o que posso lhes oferecer são meu amor e orgulho eternos.

## **Agradecimentos**

Nada na vida conquistamos sozinhos. Sempre precisamos de outras pessoas para alcançar os nossos objetivos. Muitas vezes um simples gesto pode mudar a nossa vida e contribuir para o nosso sucesso.

Aos meus pais, **Manoel e Eliana**, que além de me darem a vida, me deram a sabedoria de viver, a paciência de esperar, a força para vencer e a coragem para me re-erguer. Que me dão amor incondicional. Que muitas vezes abriram mão de seus sonhos para realização dos meus! Que foram e ainda são exemplos de pessoas para mim!

À **Profa. Dra. Maria Claudia Irigoyen**, ser humano de raríssima beleza, exemplo de determinação, de liderança a ser alcançado; meu muito obrigada pelo incentivo, apoio, orientação e o carinho ofertado, é muito bom aprender com você. Obrigada pela confiança e dedicação incessante na minha formação.

A **Profa. Dra. Vera Farah** por colocar a disposição seu laboratório.

A **Patrícia Fiorino**, pelo apoio, por colocar a disposição seu laboratório e seu tempo, além dos ensinamentos na discussão deste trabalho e discussões filosóficas sobre a vida.

A **Profa. Dra. Kátia De Angelis**, responsável pelo início da minha formação acadêmica/científica.

As minhas grandes amigas **Lisoca, Tati e Silbecas**, pela grande colaboração na realização deste trabalho, mas, principalmente, pela amizade, força, atenção e companheirismo ao longo dessa jornada.

A Minha grande amiga **Luinha** por todo auxílio, horas de discussão e idéias, mas, acima de tudo por compartilharmos sonhos e a vontade de concretizá-los.

Ao **Edson**, pelo carinho, torcida e auxílio no trabalho profissional;

Aos companheiros do laboratório pelo incentivo em todos os momentos.

A todos da divisão de experimentação do Instituto do Coração e do Mackenzie aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A **Eva, Juliana e Neuza** da secretaria do programa de pós-graduação Cardiologia, sempre solícitas no atendimento e esclarecimento das duvidas.

Ao (Cnpq) pela concessão da bolsa de doutorado.



A toda a equipe do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, por apoiar a qualificação constante, compartilhando os esforços de uma assistência, ensino e pesquisa com qualidade;

Às enfermeiras da Clínica médica do HU **Carolina, Samira, Tatiana, Thais, Isabel, Michelli, Josiane, Anna Claudia, Nivia, Fernanda, Angela**, à Chefe **Felícia**, pela amizade, união e cumplicidade na vida profissional, estar com vocês é um privilégio;

À querida equipe de enfermagem da unidade de clínica médica (**Manoel, Marilane, Evandro, Rose, Cida, Nilse, Graça, Maria e Luiz**), meu crescer, meu coração, minha vida está entrelaçada com a de vocês;

Aos meus irmãos **Cauê e Tainá**, pelo amor, apoio em todos os sentidos, amizade e incentivo em toda a minha vida.

Ao meu “**presentinho**” pela amizade sólida e verdadeira, por sua alegria e energia positiva, estando sempre ao nosso lado.

Ao meu amado e querido **Nicolas**, por me ensinar o verdadeiro significado da palavra amor.

A minha Família por ter feito o melhor por mim sempre.

Minha gratidão.

## Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. Introdução .....	1
1.1 Diabetes .....	1
1.2 Nefropatia Diabética.....	6
1.3 Cardiomiopatia Diabética .....	9
1.4 Controle Da Pressão Arterial.....	10
1.5 Desnervação Sino-Aórtica.....	12
2. Objetivo .....	16
2.1 Objetivos Específicos .....	16
3. Métodos.....	17
3.1 Animais e grupos.....	17
3.2 Delineamento Do Protocolo Experimental:.....	18
3.3 Diabetes induzido por estreptozotocina .....	18
3.4 Desnervação Sino-Aórtica.....	19
3.5 Avaliações Metabólicas.....	22
3.5.1 Glicemia Plasmática e Teste de Tolerância a Glicose (GTT).....	22
3.5.2 Avaliação da ingesta hídrica e da excreção urinária (Gaiola Metabólica).....	22

3.6 Medidas Hemodinâmicas .....	24
3.6.1 Ecodopplercardiograma .....	24
3.6.2 Canulação .....	29
3.6.3 Medidas de pressão arterial e labilidade da PA .....	31
3.6.4 Avaliação do Reflexo Pressorreceptor .....	33
3.6.5 Análise Espectral e Espectral Cruzada .....	35
3.6.6 Avaliação Do Controle Autonômico .....	36
3.7 Protocolo Experimental do Rim Isolado .....	37
3.7.1 Protocolo Experimental .....	38
3.7.2 Análise dos parâmetros renais .....	40
3.7.3 Cálculo dos parâmetros renais .....	40
3.8 Avaliação do Fluxo Sangüíneo – Método das Microesferas Coloridas	47
3.8.1 Digestão e processamento dos tecidos .....	48
3.8.2 Extração do corante e medidas de absorbância .....	49
3.8.3 Determinação do fluxo sanguíneo .....	49
3.8.4 Determinação do débito cardíaco .....	50
3.8.5 Determinação do índice cardíaco .....	51
3.8.6 Determinação da resistência vascular sistêmica total .....	51
3.9 Análise Estatística .....	51
4. Resultados .....	52
4. 1. Parâmetros metabólicos .....	52
4.1.1. Medida do peso corporal .....	52
4.1.2 Resposta à sobrecarga glicêmica .....	53

4.1.3. Avaliação da ingesta hídrica e excreção urinária (Gaiola Metabólica).....	55
4.2. Parâmetros Ecocardiográficos .....	57
4.3. Medida direta da pressão arterial e da frequência cardíaca.....	58
4.4 Avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores.....	59
4.5 Avaliação da modulação autonômica cardíaca .....	60
4.6 Avaliação no Sistema de Rim Isolado: Perfusão Renal Extracorpórea. .....	64
4.6.1 Pressão de Perfusão.....	64
4.6.2 Resistência Vascular Renal.....	65
4.6.3 Fluxo Urinário .....	66
4.6.4 Ritmo de Filtração Glomerular.....	67
4.6.5 Fluxo Plasmático Renal.....	69
4.7 Fluxos Sanguíneos Regionais.....	70
4.8 Resistências Vascular Periférica Total e Regional.....	71
4.9 Débito e Índice Cardíaco.....	72
5. Discussão.....	78
5.1 Parâmetros Metabólicos.....	78
5.1.1 Peso corporal e Resposta à sobrecarga glicêmica.....	78
5.2 Avaliação da ingesta hídrica e da excreção urinária: gaiola metabólica .....	79
5.3 Avaliações morfométricas .....	81
5.4 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas .....	85
5.5 Avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores.....	91

5.6 Avaliação da função autonômica.....	93
5.7 Domínio da frequência .....	97
5.8 Avaliação do Fluxo Sanguíneo Regional.....	99
5.9 Avaliação da Função Renal ex vivo: perfusão renal.....	101
6. Conclusões.....	103
7. Referências bibliográficas .....	105

## **Lista de abreviaturas e siglas**

ATRAMI - Autonomic tone and reflex after myocardial infarction

DC- Débito cardíaco

DM - Diabetes Mellitus

DSA - Desnervação sino aórtica

ERP - Espessura relativa da parede

FC- Frequência cardíaca

FCI- Frequência cardíaca intrínseca

FEj % - Fração de ejeção

FEnc%- Fração de encurtamento

FPR- Fluxo plasmático renal

FU- Fluxo Urinário

GC - Grupo controle

GCD- Grupo controle desnervado

GD - Grupo diabético

GDD - Grupo desnervado diabético

GTT- Teste de tolerância a glicose

HF- Banda de alta frequência

IP- Intervalo de pulso

*ip* –Intraperitoneal

LF- Banda de Baixa frequência

LV- Ventrículo esquerdo

LWV- Espessura diastólica e sistólica da parede posterior do ventrículo esquerdo

NTS- Núcleo do trato solitário

PA- Pressão arterial

PAD- Pressão arterial diastólica

PAM- Pressão arterial média

PAS- Pressão arterial sistólica

PDF- Pressão diastólica final

PP- Pressão de perfusão

PPDIA - Parede posterior na Diástole

RFG- Ritmo de filtração glomerular

RVP- Resistência vascular periférica

SIVDIA- Septo intraventricular na diástole

SNA- Sistema nervoso autônomo

STZ – Streptozotocina

TFG - Taxa de Filtração glomerular

TRIV- tempo de relaxamento isovolumétrico

VD- Ventrículo Direito

VE - Ventrículo esquerdo

VEDIA - Cavidade do ventrículo esquerdo em diástole

VESIS - Ventrículo esquerdo na sístole

VO<sub>2</sub> MÁX. - Consumo máximo de oxigênio

VPA - Variabilidade da pressão arterial

WKY- Wistar Kyoto

## **Lista de figuras**

<b>Figura 1</b> - Visão ventral do animal, com incisão expondo a musculatura do pescoço.....	20
<b>Figura 2</b> – Visão do feixe vaso - nervoso, após afastamento da musculatura do pescoço.....	21
<b>Figura 3</b> – Inervação na região da bifurcação da carótida. A: localização do nervo laríngeo superior; B: detalhe da inervação do corpo carotídeo e dos pressorreceptores carotídeos.....	21
<b>Figura 4:</b> Gaiola metabólica utilizada no protocolo experimental para avaliação do consumo hídrico, de ração e do volume urinário.....	23
<b>Figura 5-</b> Modo-M do VE, guiado pelo modo bidimensional, com o cursor posicionado entre a válvula mitral e o músculo papilar, mostrando espessura diastólica e sistólica do septo-interventricular (IVS), cavidade do ventrículo esquerdo na diástole e na sístole (LV) e espessura diastólica e sistólica da parede posterior do ventrículo esquerdo (LVW).....	28
<b>Figura 6</b> – Corte apical 4 câmaras mostrando o posicionamento do volume amostra (seta) , próximo à face ventricular da valva mitral para avaliação do fluxo transmitral no estudo do Doppler pulsátil.....	29
<b>Figura 7</b> – Sítio de dissecação para a cateterização da artéria femoral.....	30
<b>Figura 8</b> – Isolamento da artéria femoral e inserção do cateter.....	31
<b>Figura 9-</b> Esquema do sistema de registro de Pressão Arterial.....	33
<b>Figura 10:</b> Registro da pressão arterial e frequência cardíaca antes e após a administração de drogas vasoativas. Observe a resposta reflexa dos pressorreceptores.....	35



<b>Figura 11:</b> Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado de rato.....	<b>42</b>
<b>Figura 12:</b> Sistema de perfusão renal.....	<b>44</b>
<b>Figura 13:</b> Canulação do ureter (A), da canulação da artéria renal do rim direito (B), início da perfusão renal (C) e acoplamento do rim no sistema extracorpóreo (D).....	<b>46</b>
<b>Figura 14:</b> Peso corporal inicial e final dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD).....	<b>53</b>
<b>Figura 15:</b> Área sob a curva de resposta glicêmica após injeção intraperitoneal (ip) de glicose (1.5g/kg) dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD).....	<b>54</b>
<b>Figura 16:</b> Curva da resposta glicêmica após injeção intraperitoneal (ip) de glicose (1.5g/kg) dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD).....	<b>55</b>
<b>Figura 17:</b> A variância do intervalo de pulso cardíaco (IP) foi menor nos grupos Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD) em comparação ao grupo controle (GC).....	<b>61</b>
<b>Figura 18:</b> Correlação entre a sensibilidade barorreflexa (mmHg )e o nível glicêmico plasmático (mg/dL).....	<b>74</b>
<b>Figura 19:</b> Correlação entre a variabilidade do intervalo de pulso (ms <sup>2</sup> ) e o débito cardíaco (ml/ min).....	<b>75</b>
<b>Figura 20:</b> Correlação entre a sensibilidade barorreflexa (mmHg )e o fluxo coronário (ml/min/g).....	<b>76</b>

**Figura 21:** Correlação entre a sensibilidade barorreflexa (mmHg )e o fluxo renal (ml/min/g).....77

## **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1:</b> Cálculo dos Parâmetros Renais.....	<b>41</b>
<b>Tabela 2:</b> Componentes do sistema de perfusão renal.....	43
<b>Tabela 3:</b> Procedimento para retirada do rim direito.....	45
<b>Tabela 4:</b> Parâmetros avaliados na gaiola metabólica.....	56
<b>Tabela 5:</b> Parâmetros ecocardiográficos de morfometria diastólica e de função cardíaca (sistólica e diastólica) dos ratos controles, diabéticos, desnervados e desnervados diabéticos.....	58
<b>Tabela 6:</b> Pressão Arterial diastólica (PAD), sistólica (PAS) média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado Diabético (GDD).....	59
<b>Tabela 7:</b> Sensibilidade barorreflexa nos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado Diabético (GDD).....	60
<b>Tabela 8:</b> Análise espectral da banda de baixa (LF) e de alta (HF) frequência do tacograma e relação LF/HF nos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado Diabético (GDD).....	62
<b>Tabela 9:</b> Variância da pressão arterial sistólica (PAS), banda de baixa (LF) e de alta (HF) frequência do sistograma nos grupos controle (C), diabético (GD), desnervado (GCD) e desnervado diabético (GDD).....	63
<b>Tabela 10:</b> Pressão de perfusão nos rins dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD).....	65
<b>Tabela 11:</b> Resistência vascular renal nos dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD).....	66

<b>Tabela 12:</b> Fluxo urinário dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD).....	67
<b>Tabela 13:</b> Ritmo de filtração glomerular dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD).....	68
<b>Tabela 14:</b> Fluxo plasmático renal dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD).....	69
<b>Tabela 15:</b> Análise do fluxo sanguíneo regional nos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado Diabético (GDD).....	70
<b>Tabela 16:</b> Análise da resistência vascular periférica total nos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado Diabético (GDD).....	71
<b>Tabela 17:</b> Análise da resistência vascular regional nos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado Diabético (GDD)..	72
<b>Tabela 18:</b> Análise do débito cardíaco e do índice cardíaco nos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado Diabético (GDD).....	73

## Resumo

**Paulini J.** *Influência dos barorreceptores na evolução da cardiomiopatia e da nefropatia diabética em ratos [tese].* São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 154p.

Está bem documentada a importância da disfunção autonômica na evolução das complicações do Diabetes. Adicionalmente, novas e consistentes evidências indicam que o controle reflexo da circulação comandado pelos barorreceptores poderia ser um marcador prognóstico precoce no Diabetes melito, clínico e experimental. No presente projeto, testamos a hipótese de que a disfunção barorreflexa interfere no desenvolvimento da nefropatia e cardiomiopatia diabética por alterar a modulação autonômica comandada pelos barorreceptores arteriais sobre vasos e coração. Foram utilizados ratos Wistar machos (230 a 260g) divididos em 4 grupos experimentais: controle (GC, n=9), diabético (GD, n=11), desnervado (GCD, n=9) e desnervado diabético (GDD, n=8). Após 7 dias de desnervação sinoaórtica, foi realizada a indução do diabetes (DM) por estreptozotocina (STZ). Foram realizadas avaliações metabólicas, teste de tolerância a glicose e avaliações ecocardiográficas durante a terceira semana do protocolo. A partir dos 28 dias de protocolo foram realizados registros diretos da pressão arterial (PA) e avaliações da sensibilidade barorreflexas, da modulação autonômica cardiovascular (variabilidade da frequência cardíaca e da PA sistólica), análise dos fluxos sanguíneos

regionais e avaliações renais ex –vivo. Os grupos diabéticos (GD e GDD) apresentaram aumento da glicemia e redução do peso corporal, da PA e da frequência cardíaca quando comparados com os grupos não diabéticos (GC e GCD). Os grupos diabéticos apresentaram uma maior área de resposta sob a curva de resposta glicêmica quando comparados aos grupos controle, indicando assim uma intolerância maior a glicose. Nos parâmetros morfométricos, o septo interventricular (SIVDIA) mostrou-se menor nos grupos diabéticos quando comparados ao GC. A parede posterior do ventrículo esquerdo (PPDIA) mostrou-se diminuída somente no grupo diabético. Com relação ao tamanho da cavidade do ventrículo esquerdo na diástole (VEDIA), observou-se uma tendência a aumento em todos os grupos quando comparados ao controle. A massa do ventrículo esquerdo (MVE) foi menor no grupo diabético em relação ao controle e maior nos grupos submetidos à DSA quando comparados ao GC.

A função sistólica foi avaliada pela fração de ejeção (FE), na qual não foi observada diferença entre os grupos estudados. A função diastólica foi avaliada pelo tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) que foi maior no grupo diabético quando comparado ao controle. Já o grupo desnervado apresentou valores próximos ao do GC. Entretanto, o grupo desnervado diabético apresentou valores menores de TRIV quando comparado aos animais apenas diabéticos. Disfunção autonômica, avaliada pela sensibilidade barorreflexa, pela variabilidade da FC (VFC) e da PA sistólica (VPAS), foram observadas nos grupos GD, GCD e GDD em relação ao grupo C. Os fluxos sanguíneos analisados nesse protocolo (coronariano,

pulmonar, renal e muscular) apresentaram-se reduzidos em todos os grupos experimentais quando comparados ao GC. O grupo submetido à SAD mostrou uma redução mais acentuada em todos os fluxos sanguíneos estudados. A resistência vascular periférica total encontra-se aumentada em todos os grupos analisados com um aumento maior nos grupos diabéticos. O débito cardíaco mostrou-se reduzido em todos os grupos estudados, em especial no grupo desnervado diabético, quando comparados com o GC. Com relação ao índice cardíaco, também observamos uma redução em todos os grupos, com uma redução maior nos grupos diabéticos sendo que a desnervação não foi capaz de atenuar essa redução no grupo desnervado diabético. A avaliação renal mostrou um aumento da pressão de perfusão do GD, acompanhado por um aumento significativo na resistência vascular renal, no fluxo urinário, no ritmo de filtração glomerular. Dessa forma, os resultados obtidos no presente trabalho fornecem evidências de que o papel homeostático do baroreflexo é essencial no curso das alterações cardíacas e renais tanto em animais normoglicêmicos como nos hiperglicêmicos, por sua ação não só no controle das variações momento a momento (labilidade) como também interferindo em alterações sustentadas da PA, como observado nesse trabalho. Esses resultados poderão dar suporte a estudos populacionais que associam maior sensibilidade do baroreflexo com melhor prognóstico e sobrevida após evento cardiovascular em indivíduos diabéticos.

**Descritores:** Diabetes mellitus, Desnervação sinoaórtica, Barorreflexo, Cardiomiopatia, Nefropatia e Fluxo Sanguíneo.

## **ABSTRACT**

**Paulini J.** *Baroreceptor influence on the evolution of diabetic cardiomyopathy and nephropathy in rats* [thesis]. Sao Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo (Brazil); 2011. 154p.

It is well documented the importance of autonomic dysfunction in microvascular complications of diabetes. Additionally, new and consistent evidence indicates that the reflex control of movement is controlled by the baroreceptors could be an early prognostic marker in diabetes mellitus, clinical and experimental. In this project, we tested the hypothesis that baroreflex dysfunction interferes with the development of nephropathy and diabetic cardiomyopathy by altering the autonomic modulation controlled by the arterial baroreceptors on heart and blood vessels. We used male Wistar rats (230 to 260g) were divided into four groups: control group (n = 9), diabetic (GD, n = 11), denervated (GCD, n = 9) and diabetic denervated (GDD, n = 8). After 7 days of sinoaortic denervation was performed we induced diabetes (DM) by streptozotocin (STZ). We evaluated metabolic, glucose tolerance test and echocardiographic evaluations during the third week of the protocol. After 28 days of protocol records were taken direct blood pressure (BP) and baroreflex sensitivity assessments of cardiovascular autonomic (heart rate variability and systolic BP), regional blood flow analysis and evaluations kidney ex vivo. Diabetic groups (GD and GDD) had higher blood glucose and reduced body weight, blood pressure and heart rate when



compared with non-diabetic groups (GC and GCD). Diabetic groups showed a larger response area under the glycemic response curve when compared to control groups, thus indicating an increased glucose intolerance. The morphometric parameters, interventricular septum (IVSD) was lower in both diabetic groups compared to CG. The back wall of the left ventricle (PPDIA) was reduced only in diabetic mice. Regarding the size of the cavity of the left ventricle during diastole (Vedia), there was a tendency to increase in all groups compared to control. The left ventricular mass (LVM) was lower in the diabetic group compared to control, and higher in the groups submitted to DSA when compared to CG.

Systolic function was evaluated by ejection fraction (EF), in which there was no difference between groups. Diastolic function was evaluated by isovolumic relaxation time (IVRT) was greater in the diabetic group compared to control. The denervated group showed similar to the CG. However, the denervated diabetic group showed lower values of IVRT as compared to diabetic animals only. Autonomic dysfunction, as assessed by baroreflex sensitivity by HR variability (HRV) and systolic (VPAS) were observed in groups GD, GCD and GDD than in group C. The blood flows analyzed in this protocol (coronary, pulmonary, kidney and muscle) were reduced in all experimental groups compared to CG. The group submitted to SAD showed a marked reduction in all blood flows studied. The total peripheral vascular resistance is increased in all groups with a greater increase in the diabetic group. Cardiac output was reduced in all groups, especially in denervated diabetic group compared with the GC. With respect to cardiac index, we also observed a reduction in all

groups, with a greater reduction in the diabetic group and that denervation was not able to mitigate this reduction in denervated diabetic group. The evaluation showed an increase in renal perfusion pressure of the GD, accompanied by a significant increase in renal vascular resistance, urinary flow, the glomerular filtration rate. Thus, the results obtained in this study provide evidence that the homeostatic role of the baroreflex is essential in the course of changes in both heart and kidney as in hyperglycemic animals normoglycemic by acting not only in control of changes moment to moment (lability) as well as interfering with sustained changes in BP, as observed in this study. These results could support population studies linking higher sensitivity of the baroreflex with a better prognosis and survival after a cardiovascular event in diabetic subjects.

**Keywords:** Diabetes mellitus, denervation sinoaórtica, Baroreflex, cardiomyopathy, nephropathy and Blood Flow.

## INTRODUÇÃO

---

# **1. Introdução**

## **1.1 Diabetes**

Define-se diabetes mellitus (DM) como uma doença crônico-degenerativa caracterizando-se por ser uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta e/ou incapacidade da insulina exercer seus efeitos, caracterizando-se por hiperglicemia crônica, com distúrbios do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009).

De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005), a prevalência mundial que foi de 4%, (135 milhões de portadores) em 1995, está projetada para, 5.4% no ano de 2025 (300 milhões de pessoas) representando um aumento na incidência de 122% (King e cols., 1998). Só nos países do continente americano a prevalência da população diabética poderá chegar a 64 milhões até o ano de 2025. Enquanto que no Brasil, estes números serão em torno de 11,6 milhões até a mesma data, sendo atualmente o sexto país com maior incidência de casos no mundo (King e cols., 1998).

Estes índices vêm crescendo em decorrência de vários fatores, tais como processo de modernização, maior taxa de urbanização, industrialização, hábitos alimentares inadequados, inatividade física, obesidade, estresse, aumentos da expectativa de vida e maior sobrevivência das pessoas com diabetes (Zanetti, 1996; Tavares, 1997). Além desses fatores

que propiciam o aparecimento do diabetes, existem outros, talvez de cunho sócio-econômico, que aumentam a morbi-mortalidade da doença. Na maioria dos países aproximadamente 50% dos pacientes desconhecem sua doença, por isso não se tratam e cerca de 20 a 30% dos que conhecem a doença, não fazem nenhum tipo de tratamento (Malerbi & Franco, 1992). Geralmente após a manifestação clínica de alguma de suas complicações crônicas, de forma casual, 68% dos casos de diabetes são diagnosticados, fato pelo qual cerca de dois terços da população de diabéticos correm o risco de apresentarem tais complicações em virtude da demora no diagnóstico da doença (Gagliardino et al., 2002).

O diabetes normalmente vem acompanhado de complicações crônicas características, geralmente denominadas de doença microvascular (específica do diabetes), doença macrovascular (aterosclerose com início mais precoce no diabetes) e doença neuropática. Estas complicações ocorrem tanto no diabetes tipo 1 como no diabetes tipo 2, embora com algumas diferenças: a doença macrovascular é a maior causa de morbimortalidade no diabetes tipo 2, provavelmente pela idade de início e síndrome metabólica associada. A doença microvascular manifesta-se com maior frequência e intensidade no diabetes tipo 1, provavelmente pela maior duração da doença e maior gravidade no quadro glicêmico (Duncan, 1996). Vale ressaltar que a causa mais freqüente de mortalidade no diabetes é a doença cardiovascular, sendo a principal responsável pelo pior prognóstico nestes pacientes (Muir et al., 1992).

Estudos de Framingham demonstraram que a hiperglicemia diabética dobra o risco de desenvolvimento de doenças cardiocirculatórias nos homens e triplica nas mulheres (Muir et al., 1992). Além disso, os mesmo autores demonstraram que indivíduos diabéticos apresentam maiores riscos de lesões coronarianas, insuficiência cardíaca congestiva, infartos recorrentes, arritmias e choque cardiogênico, quando comparados à população não diabética.

As anormalidades vasculares que levam à nefropatia e à retinopatia diabéticas são também identificadas na circulação sistêmica. Sendo assim, é plausível que o desenvolvimento de alterações funcionais precoces, que por sua vez conduzem à neuropatia diabética e à disfunção autonômica, seja em parte resultante de anormalidades neurovasculares (Cameron & Cotter, 1994). De fato, o sistema nervoso periférico está freqüentemente comprometido em pacientes diabéticos (Pickup & Williams, 1994).

A neuropatia diabética autonômica é uma importante e freqüente complicação do diabetes e está associada à alta morbidade e mortalidade em pacientes sintomáticos (Ewing et al., 1980, Vinik, 1992). Entre suas maiores manifestações clínicas encontram-se taquicardia de repouso, intolerância ao exercício, hipotensão ortostática, constipação, gastroparesia, disfunção erétil, função neurovascular alterada e insuficiência autonômica hipoglicêmica. A neuropatia autonômica cardiovascular é a mais estudada e clinicamente mais importante forma de neuropatia autonômica diabética. A neuropatia autonômica cardiovascular resulta da lesão de fibras nervosas autonômicas que inervam o coração e os vasos levando a anormalidades do

controle da frequência cardíaca e da dinâmica vascular. A redução da variabilidade da frequência cardíaca é o mais precoce indicador de neuropatia cardiovascular (Ziegler D, 1994, Fazan et al., 1997).

O aumento da mortalidade associado à neuropatia autonômica cardiovascular pode estar relacionado a alterações no controle cardiovascular, incluindo atenuação do controle reflexo autonômico levando à hipotensão ortostática, infarto do miocárdio não acompanhado de sensação dolorosa e morte súbita (Page & Watkins, 1978), esta possivelmente determinada por episódios de dessaturação (Neumann et al., 1995) ou arritmias. Existem evidências de que a disfunção simpática cardíaca no diabetes envolve áreas de desnervação (distal) tanto quanto áreas de hiperinervação (proximal) do ventrículo esquerdo, o que facilitaria as arritmias malignas por alterar a estabilidade elétrica e/ou comprometer o fluxo sanguíneo miocárdico (Stevens et al., 1998).

Indivíduos diabéticos são mais predispostos à insuficiência cardíaca congestiva, independentemente da presença de doença coronariana ou hipertensão. Isto é possível pela presença da chamada cardiomiopatia diabética, evidenciada por estudos experimentais, clínicos, patológicos e epidemiológicos. A cardiomiopatia diabética provoca mudanças estruturais e funcionais em indivíduos diabéticos. Cerca de 60% destes pacientes, normotensos, têm disfunção sistólica, diastólica e redução do consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$  máx.) (Zaslavsky et al., 2005; Brandenburg et al., 1999).

Modelos experimentais pelo uso de agentes diabetogênicos como a estreptozotocina (STZ) e o aloxano têm sido usados na indução do diabetes experimental em ratos, tendo se demonstrado eficiente no estudo das alterações da função ventricular esquerda (Wichi et al., 2007; Borges et al., 2006), bem como do sistema nervoso autônomo (Junod et al., 1969; Vadlamudi & McNeill, 1983). As várias complicações crônicas micro e macrovasculares, além dos desequilíbrios hidroeletrolítico e da homeostase, estão presentes também no diabetes experimental (Schaan e cols, 2001). Ratos tratados com estreptozotocina desenvolvem quadro de polidipsia, maior volume extracelular (Ilstrup e cols., 1981) e urinário, refletindo a diurese osmótica provocada pela hiperglicemia (Junod e cols., 1969), além de microalbuminúria (Schaan e cols, 2001). Estudos do nosso grupo têm demonstrado que o diabetes induzido por STZ produz bradicardia e alteração de reflexos cardiovasculares (Dall'Ago e cols., 1997; De Angelis e cols., 2000; Maeda e cols., 1995; Oliveira e cols., 1997; Schaan e cols., 2004; De Angelis e cols., 2009). Tais alterações ocorrem precocemente 5 dias após a administração de STZ (Maeda e cols., 1995) e persistem por períodos de, pelo menos, até 80 dias (De Angelis e cols., 2000).

Embora seja um modelo de deficiência de insulina, muitos animais sobrevivem sem sua administração por longos períodos (Fazan et al., 1997), permitindo o estudo das complicações do diabetes não controlado. Dessa forma, o diabetes experimental induzido por estreptozotocina , tem sido



usado por vários investigadores na busca de melhor compreensão das alterações da cardiomiopatia diabética e do controle autonômico.

Os diabéticos têm alto risco para a doença macrovascular (doença cardiovascular, 3 a 4 vezes, e cerebrovascular, 2 a 3 vezes), e esta é sua principal causa de morte (Kannel & Mc Gee, 1979). Diversos fatores de risco passíveis de intervenção, como a nefropatia diabética e hipertensão arterial sistêmica estão associados ao maior comprometimento cardiovascular observado nesses pacientes diabéticos.

## **1.2 Nefropatia Diabética**

A nefropatia diabética é uma complicação que acomete cerca de 30% a 40% dos pacientes, está associada a um aumento da mortalidade e evolui inexoravelmente para a perda progressiva de função renal, necessitando o uso de medidas de reposição da função renal através de hemodiálise e de transplante (Ritz e cols., 1999).

A doença renal no diabético pode se desenvolver lenta ou rapidamente, levando o paciente à insuficiência renal crônica. O declínio funcional do rim dos diabéticos pela nefropatia é previsível e progressivo. Depois de instalada a nefropatia, a perda mensal da função renal varia de 0,5-1%.

Existem evidências de que fatores genéticos e ambientais corroborem para o aparecimento da nefropatia diabética.

A nefropatia é resultado de uma somatória de fatores hemodinâmicos e metabólicos sobre a microcirculação renal, que culminam com a esclerose glomerular. Os fatores hemodinâmicos exercem um papel-chave na gênese da lesão renal, através de anormalidades na hemodinâmica intraglomerular, dos efeitos deletérios da hipertensão arterial sistêmica e via produção renal de citocinas. Igualmente importantes, são as conseqüências metabólicas da hiperglicemia, que por diversos mecanismos, induzem lesões renais (Zanella, 2006).

A doença renal do diabetes melitus não-controlado pode evoluir quase sempre com esclerose glomerular e atrofia tubular, com perda total de função renal, levando o paciente à diálise ou ao transplante renal (Bruno & Gross, 2000, Lagranha e cols, 2007). Segundo Zanella (2006), durante a evolução da doença, um número progressivamente menor de néfrons segue funcionando adequadamente. Na teoria mais consistente, os glomérulos dos néfrons ainda funcionantes sofreriam um processo de hipertrofia devido à hiperperusão conseqüente, à redução do leito capilar glomerular total e a vasodilatação de suas arteríolas aferentes. Essa hiperperusão levaria à uma hipertensão glomerular, com conseqüente hiperfiltração glomerular e a lesão das estruturas glomerulares. Essas alterações funcionais e morfológicas determinam o aparecimento de proteinúria, sendo esse intenso tráfico de proteínas lesivo às estruturas tubulares (tanto por seu próprio metabolismo, como por suas substâncias agregadas).

Diversos fatores de risco têm sido descritos para a nefropatia diabética, entre eles, o grau de hiperglicemia, a duração do diabetes, a presença de hipertensão arterial, fatores genéticos, entre outros (Ritz e cols., 1999); neste sentido, marcadores de nefropatia diabética estão sendo enfaticamente procurados e a presença de microalbuminúria é um dos fatores predisponentes mais estudados. A presença de microalbuminúria está associada, de mesma forma, aos fatores de risco da nefropatia diabética, à resistência insulínica e à síndrome metabólica (Isomaa e cols., 2001).

O aumento da taxa de filtração glomerular (TFG) tem sido um achado freqüente no diabetes (Allen e cols., 1997; Bank e cols., 1993; Komers e cols., 1994; Komers e cols., 1996; Tolins e cols., 1993; Tomlinson e cols., 1992) que, em longo prazo, pode responder pela perda progressiva de função renal atribuída a hiperfiltração (De Angelis e cols., 2002) e, conseqüente, nefroesclerose (D'Agord e cols., 2001). O mecanismo proposto para explicar o aumento da TFG no diabetes não está totalmente esclarecido. Mas a maior parte dos trabalhos sugere a hipótese de alterações hemodinâmicas glomerulares, mediadas por modificações de sistemas hormonais intra-renais (Allen e cols., 1997). Além disso, alterações de tônus neurogênico periférico sobre o rim, especialmente aquelas moduladas pelo barorreflexo podem estar contribuindo para este achado, embora não existam informações sobre isso na literatura.

### 1.3 **Cardiomiopatia Diabética**

A cardiomiopatia diabética é vista, atualmente, como resultado de complexas relações entre anormalidades metabólicas que acompanham o diabetes e suas conseqüências moleculares, levando a alteração da estrutura e função miocárdica (Poornima et al., 2006).

Estudos experimentais sobre a função miocárdica em ratos diabéticos por estreptozotocina mostraram insuficiência ventricular em corações isolados perfundidos de animais expostos à isquemia por 48 horas, havendo um acúmulo intracelular de metabólitos, aumento da oxidação de ácidos graxos e um efeito tóxico nos sistemas enzimáticos intracelulares. O fato de o tratamento agudo com insulina reverter às anormalidades induzidas pelo diabetes leva a crer num fator metabólico como causa das alterações funcionais da célula miocárdica no DM, (Gotzsche, 1986). Além disso, em nosso laboratório foi detectado prejuízo na função ventricular “in vivo” (Wichi et al., 2004) e no coração isolado (De Angelis et al., 2000) de ratos diabéticos

Resultados recentes sobre o curso temporal das alterações cardíacas avaliadas pelo ecocardiograma em nosso laboratório mostraram que 30 dias após a administração de STZ, existe comprometimento da função e da estrutura cardíaca. (Malfitano et al, 2004). Nesse estudo, a dilatação do ventrículo esquerdo (VE) foi acompanhada de redução da espessura da parede posterior do VE e do septo interventricular, indicando redução da massa do VE, dados que corroboram os achados de Dobrzynki et al. que

observaram redução do peso do coração e da massa do VE associados a disfunção cardíaca e renal 21 dias após a administração de STZ.

Os mecanismos envolvidos nestas disfunções ainda não estão perfeitamente esclarecidos, mas existem evidências consistentes do envolvimento de alterações na frequência cardíaca intrínseca, no tônus vagal e no controle reflexo de frequência cardíaca (barorreflexo e quimiorreflexo) neste prejuízo cardiovascular (De Angelis et al. 2002).

#### **1.4 Controle Da Pressão Arterial**

A perfusão tecidual adequada é garantida pela manutenção da força motriz da circulação - a pressão sanguínea - em níveis adequados e razoavelmente constantes, esteja o indivíduo em repouso ou desenvolvendo diferentes atividades. A pressão, definida como força/unidade de área, é uma entidade física. A pressão arterial (PA), portanto, dependem de fatores físicos como o volume sanguíneo e a capacitância da circulação, sendo resultante da combinação instantânea entre o volume minuto cardíaco (ou débito cardíaco = frequência cardíaca x volume sistólico), a resistência periférica e a capacitância venosa, que condiciona a pré-carga e, portanto, o volume sistólico. Cada um destes determinantes primários da PA é por sua vez determinado por uma série de fatores (Michellini, 1999; Kaplan, 1998). A manutenção (componente tônico), bem como a variação momento a momento da PA (componente fásico) dependem de mecanismos complexos e redundantes que determinam ajustes apropriados da frequência e

contratilidade cardíacas, do estado contrátil dos vasos de resistência e de capacitância e da distribuição de fluído dentro e fora dos vasos. A variação do tônus vascular depende de diferentes fatores funcionais. Dentre eles, destaca-se a atividade simpática gerada centralmente e modulada por aferências de diferentes reflexos e por substâncias vasopressoras ou vasodepressoras circulantes ou produzidas pelas células da musculatura lisa ou endoteliais. Um considerável número de evidências dá suporte ao aumento da atividade simpática precocemente na hipertensão (Dequattro e Feng, 2002; Irigoyen e cols., 2001). Sabe-se que embora muitos reflexos estejam envolvidos na modulação da atividade simpática, os barorreceptores arteriais (alta pressão) são considerados o mais importante mecanismo de controle reflexo da PA, momento a momento. A deformação da parede dos vasos induzida por aumentos da PA gera potenciais de ação que são conduzidos ao núcleo do trato solitário (NTS), no sistema nervoso central. A partir daí, são produzidas respostas de aumento da atividade vagal e queda da frequência cardíaca bem como de redução da atividade simpática para o coração e os vasos, contribuindo para a bradicardia, reduzindo a contratilidade cardíaca e a resistência vascular periférica e aumentando a capacitância venosa. A menor sensibilidade dos barorreceptores é provavelmente o maior determinante do aumento da variabilidade da PA (Irigoyen e Krieger, 1998; Floras e cols., 1988) associada às conseqüentes lesões dos órgãos-alvo (Floras e cols., 1988). O controle reflexo da circulação comandado pelos barorreceptores tem sido reconhecido também como um importante preditor de risco após evento cardiovascular. De fato, o

estudo ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) forneceu evidências clínicas do valor prognóstico da sensibilidade do barorreflexo e da variabilidade da frequência cardíaca na mortalidade cardíaca pós infarto do miocárdio, independente da fração de ejeção do ventrículo esquerdo e de arritmias ventriculares (La Rovere e cols., 1998).

Dessa forma, intervenções no sentido de melhorar a sensibilidade do barorreflexo e/ou a participação do parassimpático cardíaco no controle da PA e da frequência cardíaca têm sido vistas como novas estratégias no manejo das doenças cardiovasculares (La Rovere e cols., 2002).

Embora exista consenso de que no diabetes clínico e experimental ocorre prejuízo do controle reflexo da circulação (De Angelis et al, 2000; Loimaala, 2003), não existem dados sobre a contribuição da função barorreflexa sobre a evolução temporal da cardiomiopatia diabética.

### **1.5 Desnervação Sino-Aórtica**

A manutenção da pressão arterial (PA) envolve um controle rígido mediado tanto por mecanismos periféricos quanto centrais.

O tamponamento das flutuações da PA evitando alterações na perfusão tecidual é uma das mais importantes funções dos reflexos comandados pelos barorreceptores. Os pressorreceptores aórticos e carotídeos constituem-se em terminações nervosas livres na parede do vaso e é considerado o mais importante mecanismo de controle momento-a-momento da pressão arterial (PA) (Krieger e Michelini, 1992). A comprovação

da ação inibitória dos pressorreceptores sobre a atividade simpática é dada pelo efeito hipertensor agudo após sua retirada. A secção cirúrgica das fibras aferentes dos pressorreceptores é denominada desnervação sino-aórtica (DSA) e foi descrita no rato por Krieger (1964). A DSA leva a uma conseqüente ativação de vias simpáticas principalmente para coração, rins e vasos de resistência, provocando elevação da PA e aumento de sua labilidade (Krieger, 1970, 1984).

Na fase inicial da DSA, o aumento da atividade simpática e da PA é predominante (Irigoyen e cols. 1988); já na fase crônica, a normalização da PA e atividade nervosa simpática renal reflete o balanço entre efeitos opostos entre presso e quimiorreceptores (Irigoyen e cols. 1995). Uma característica importante deste modelo é o aumento da labilidade da pressão, que se mantém mesmo após a normalização desta (Barres e cols., 1992).

No início da década de 1980, Friberg e colaboradores (1982) demonstraram que a variabilidade da PA (VPA) estava aumentada em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), se comparados a linhagens de ratos normotensos. No ano seguinte, Mancina e colaboradores (1983), estudando grupos de pacientes normotensos, com hipertensão moderada e hipertensão severa, demonstrou que havia um aumento da VPA quanto mais grave a hipertensão. Estes e outros estudos abriram caminho para o uso de um modelo de alta VPA e sem hipertensão, consistindo na DSA crônica (Su e Miao, 2001), mesmo considerando a demonstração de que a DSA induz alterações estruturais cardiovasculares, incluindo hipertrofia do coração e



hipertrofia vascular (Su e Miao, 2001; Van Vliet e cols., 1996). De fato, nesse trabalho, Van Vliet et al, demonstraram que a desnervação carotídea bilateral causava hipertrofia ventricular direita, enquanto a desnervação aórtica e/ou sino-aórtica levava à hipertrofia ventricular esquerda, todas essas alterações independentes de um aumento na pressão arterial. Dados de nosso laboratório não publicados, entretanto, através da avaliação ecocardiográfica, não identificaram alterações morfométricas em ratos, 26 dias após a desnervação sino-aórtica (DSA), embora esse tipo de alteração tenha sido observado em outros tempos de desnervação. (Da Silva ICM et al, 2010; Mostarda et al, 2010). Além disso, dados anteriores de nosso laboratório (Oliveira et al, 1992) não mostraram diferenças dos efeitos da DSA em ratos normais ou diabéticos por STZ. É sabido, entretanto, que a DSA produz aumento da atividade simpática periférica e labilidade da PA agudamente, e mantém a labilidade da PA na fase crônica (20 dias ou mais) (Irigoyen et al, 1995).

Considerando que dois dos principais marcadores da atividade do sistema nervoso autônomo são: a sensibilidade do barorreflexo e a variabilidade da frequência cardíaca, bem como o fato de que a disfunção autonômica está associada com um aumento da mortalidade, especialmente em diabéticos, hipertensos e sujeitos com história de doença cardiovascular (Gerritsen et al, 2001) e, além disso, considerando a escassa informação disponível na literatura sobre a evolução das lesões cardíacas e renais do diabetes e sua relação com a modulação autonômica do coração e da circulação, no presente projeto testamos a hipótese de que a desnervação

sino-aórtica crônica, por alterar a modulação autonômica periférica comandada pelos pressorreceptores arteriais, modifica o desenvolvimento da nefropatia e cardiomiopatia diabéticas avaliadas 21 dias após a administração de STZ.

## **OBJETIVOS**

---

## 2. Objetivo

Avaliar a influência da integridade dos pressorreceptores nos parâmetros cardiovasculares e na função renal no diabetes experimental com 21 dias de duração.

### 2.1 Objetivos Específicos

Avaliar em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) com ou sem desnervação sino-aórtica:

1. As alterações bioquímicas e metabólicas;
2. As alterações morfométricas e funcionais cardiovasculares através da ecocardiografia;
3. A pressão arterial, frequência cardíaca e balanço autonômico usando a análise espectral;
4. A função renal em preparação de rim isolado, modelo de perfusão renal *ex-vivo*.
5. Os fluxos sanguíneos regionais; o débito cardíaco, índice cardíaco e a resistência vascular periférica total e regional.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### 3. Métodos

#### 3.1 Animais e grupos

A presente tese teve a aprovação do seu projeto pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (número de protocolo: 1064/04).

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 230 e 260g, provenientes do biotério da Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos agrupados, em ambiente com temperatura (22 – 24°C) e luz controladas (ciclo de 12 horas claro/escuro). Água e comida foram oferecidas de modo irrestrito, sendo a dieta normoprotéica. Os animais foram randomicamente divididos em quatro grupos a seguir relacionados.

✓ GRUPO I - **Controle (GC)**- Foi submetido à cirurgia sham de desnervação e acompanhados durante 28 dias (n=09).

✓ GRUPO II – **Diabético (GD)** - O diabetes foi induzido no início do protocolo (dia 1) e os animais foram acompanhados durante 21 dias (n=11).

✓ GRUPO III - **Controle Desnervado (GCD)**- Foram desnervados e acompanhados durante 28 dias (n=09).

✓ GRUPO IV - **Diabético Desnervado (GDD)**- O diabetes foi induzido 7 dias após a desnervação e acompanhados por 21 dias (n=08).

### **3.2 Delineamento Do Protocolo Experimental:**

Semana 0: Realização da desnervação sino-aórtica;

Semana 1 Indução do diabetes;

Semana 2: Acompanhamento do diabetes experimental, com primeira medida da glicemia;

Semana 3: Avaliação em gaiola metabólica e teste de tolerância a glicose GTT;

Semana 4: Avaliação ecocardiográfica; Cateterização dos animais e registro da PA e FC;

Experimentos com rim isolado (*ex-vivo*)

Análise de fluxos, resistências, índice e débito cardíaco.

Sacrifício dos animais e coleta de tecidos.

### **3.3 Diabetes induzido por estreptozotocina**

Após jejum de 8 horas, os animais foram anestesiados com éter etílico e o diabetes foi induzido por uma única injeção endovenosa de estreptozotocina (STZ, 50mg/Kg, e.v., Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) na veia caudal (Rerup, 1970). A estreptozotocina foi dissolvida em tampão citrato (0,01M, pH 4,5) e injetada cerca de 5 minutos após sua diluição. Os animais controles foram injetados somente com tampão citrato (Junod et al., 1969).

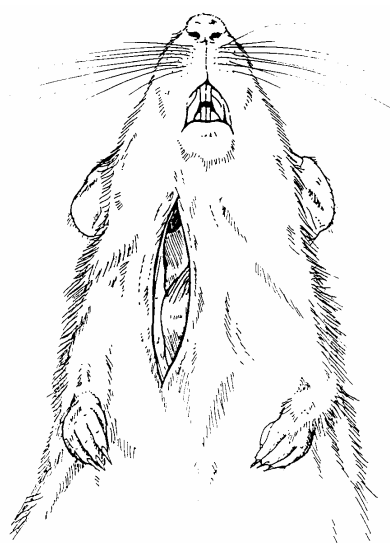
Quarenta e oito horas após a indução, os animais foram novamente submetidos a jejum de 8 horas para verificar a ação da estreptozotocina. A dosagem da glicemia foi realizada por hemoglicoteste, através de tiras Advantage (Advantage - RocheR). Foram selecionados para os grupos diabéticos os animais que apresentaram glicemia acima de 250 mg/dL.

### **3.4 Desnervação Sino-Aórtica**

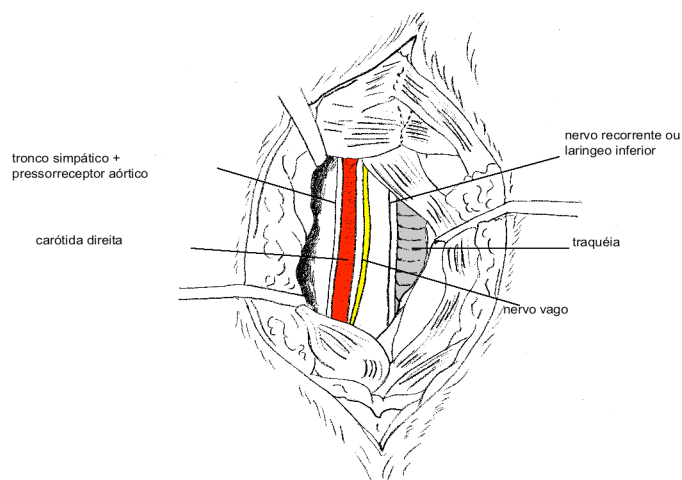
Foi utilizado o método de desnervação sino-aórtica (DSA) descrito para o rato por Krieger (1964), que consiste em uma incisão mediana na região cervical anterior (Figura 1), separação dos músculos pré-traqueais e localização bilateral do feixe vaso-nervoso (Figura 2), constituído pela artéria carótida, nervo vago e tronco simpático. As fibras pressorreceptoras aórticas que trafegam junto ao tronco simpático ou como nervo isolado foram seccionadas. O outro contingente de fibras aórticas que situava-se junto ao laríngeo inferior foi interrompido quando seccionou-se o laríngeo superior ou como fibras isoladas junto ao laríngeo inferior (Krieger & Marseillan, 1964).



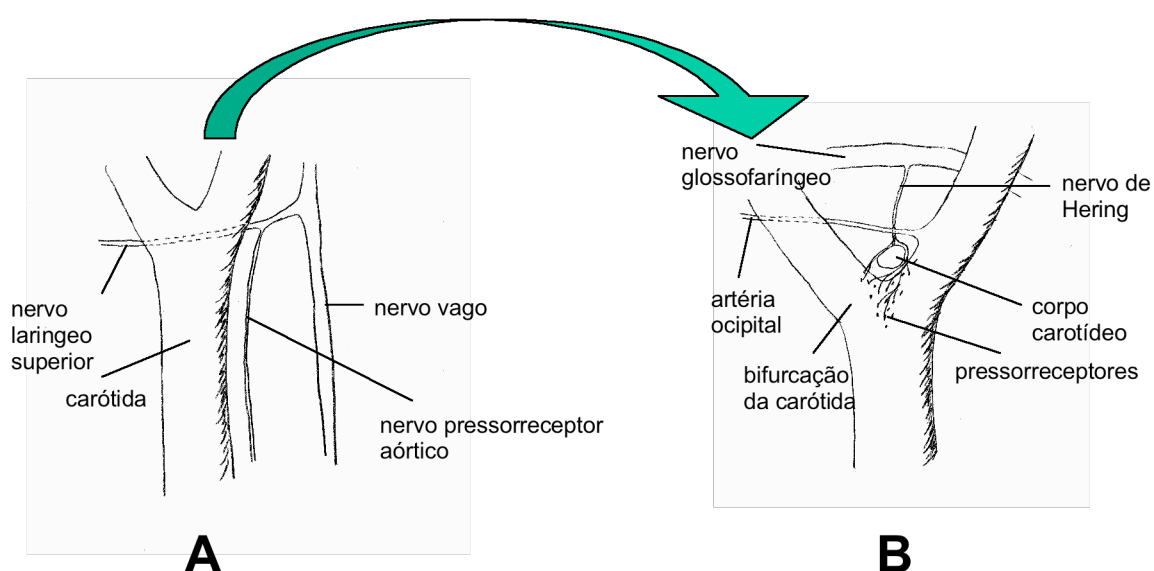
Em um plano superior, a bifurcação da carótida comum foi localizada (Figura 3, A e B), exposta e dissecada completamente nos dois lados (secionando-se as fibras carotídeas e destruindo-se o corpúsculo carotídeo). Logo após, o nervo laríngeo superior foi secionado bilateralmente. O procedimento cirúrgico foi realizado mediante protocolo anestésico que se consistiu de Ketalar (50mg/kg Parke-Davis, Brasil) + Rompun (10mg/kg Bayer, Brasil), administrados por via intraperitoneal. Após a cirurgia os animais receberam 0,2 ml de antibiótico intramuscular (Benzetacil, Fontoura-Wyeth, Brasil).



**Figura 1** - Visão ventral do animal, com incisão expondo a musculatura do pescoço.



**Figura 2** – Visão do feixe vaso - nervoso, após afastamento da musculatura do pescoço.



**Figura 3** – Inervação na região da bifurcação da carótida. A: localização do nervo laríngeo superior; B: detalhe da inervação do corpo carotídeo e dos pressorreceptores carotídeos.

### **3.5 Avaliações Metabólicas**

#### **3.5.1 Glicose Plasmática e Teste de Tolerância a Glicose (GTT)**

As concentrações de glicose sanguíneas foram determinadas usando Accu-Check Advantage Blood Glucose Monitor (Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN).

Para a avaliação da glicemia foram coletadas amostras de sangue (100  $\mu$ l) dos diferentes grupos experimentais após jejum de 6 horas. Os ratos diabéticos que apresentaram níveis plasmáticos de glicose inferior a 250 dl/ml ou superior a 400 dl/ml foram excluídos do grupo.

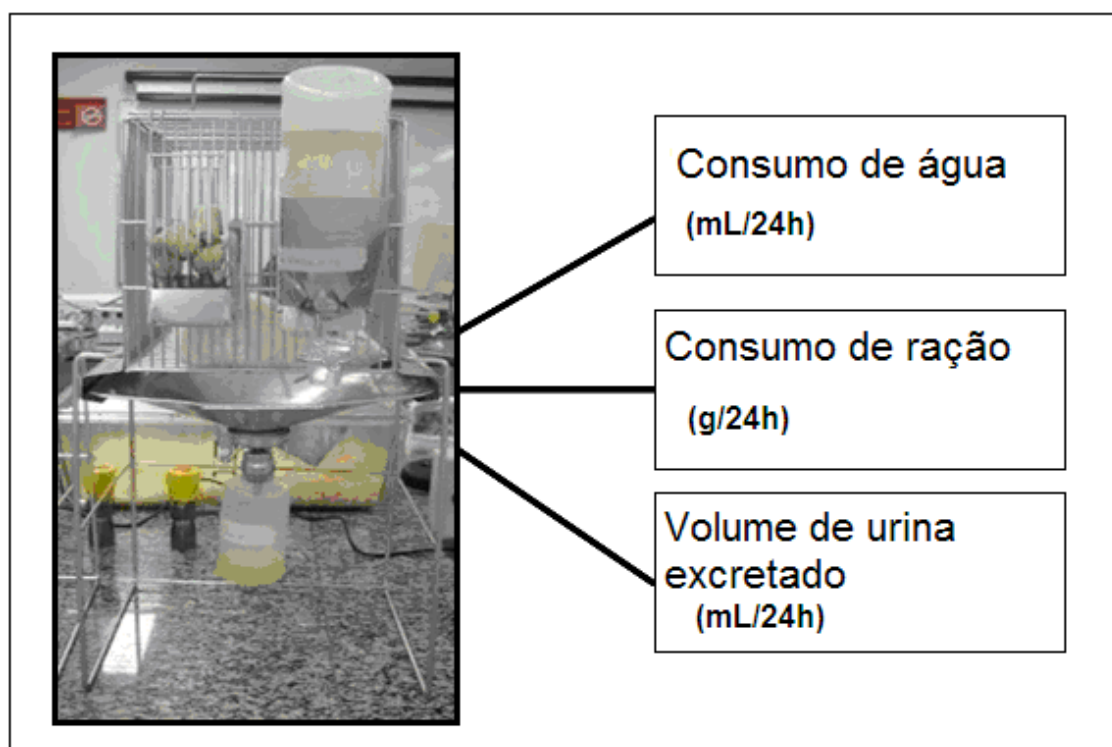
O GTT foi realizado após 3 semanas (21 dias) da indução do diabetes. Os animais permaneceram em jejum por 6 horas e amostras de sangue foram coletadas de um pequeno corte realizado na cauda do animal nos tempos zero, 5, 15, 30 e 60 min após injeção intraperitoneal (ip) de glicose (1.5g/kg).

#### **3.5.2 Avaliação da ingestá hídrica e da excreção urinária (Gaiola Metabólica)**

Para obtenção da urina e do volume urinário, para posteriores análises bioquímico, os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas (Nalgene), no 18º dia após a administração de STZ, e lá permaneceram

durante 48 horas para adaptação e mais 24 horas para a coleta, animais dos diferentes grupos estudados foram avaliados ao mesmo tempo..

As análises bioquímicas da urina consistiram de: creatinina, proteínas totais, uréia, sódio, potássio, microalbuminúria e/ou proteinúria, e foram realizadas em colaboração com o laboratório de análises clínicas do InCor-HC, sob os cuidados da Dra. Célia Strunz.



**Figura 4:** Gaiola metabólica utilizada no protocolo experimental para avaliação do consumo hídrico, de ração e do volume urinário.

### **3.6 Medidas Hemodinâmicas**

#### **3.6.1 Ecodopplercardiograma**

O ecodopplercardiograma foi realizado nos grupos estudados no 27º dia de protocolo.

Após anestesia com uma solução intraperitoneal de Ketalar (50mg/Kg, Parke-Davis, Brasil) e Rompun (10mg/Kg, Bayer, Brasil), os animais tiveram a região torácica devidamente tricotomizada e foram mantidos em decúbito lateral para a realização do exame no aparelho SEQUOIA 512 (ACUSON, Corporation, Mountain View, CA- EUA), com transdutor linear multifreqüencial (10-14mHz), que permite imagens bidimensional e monodimensional simultâneas, além da análise de fluxo por efeito doppler espectral e registro eletrocardiográfico, mediante a colocação de três eletrodos para a derivação DII. O estudo do Doppler tecidual para análise da velocidade de relaxamento das paredes do VE também foi realizado, pela colocação do volume-amostra ao nível do anel mitral da parede septal e lateral do VE. A profundidade de imagem trabalhada foi de 2 cm.

Foram utilizadas as janelas longitudinais paraesternal direita para a obtenção dos cortes longitudinal e transversal e a longitudinal paraesternal esquerda para a obtenção dos cortes apical (quatro e cinco câmaras). As medidas lineares foram realizadas nas imagens obtidas pelo modo-M, conforme Schiller e cols., (1979), com as seguintes medidas: espessura diastólica do septo-interventricular (SIVDIA), diâmetro do VE ao final da

diástole (VEDIA) e ao final da sístole (VESIS), espessura diastólica da parede posterior (PPDIA). A massa ventricular esquerda foi então, obtida a partir da fórmula:  $1,047 \times [(SIVDIA+VEDIA+PPDIA)^3 - VEDIA^3] \times 0,8 + 0,6$  onde: 1,047 representa a densidade do miocárdio, validada em ratos (Fard e cols., 2000) e os índices 0,8 e 0,6, fatores de correção. Após a obtenção destas medidas, obtivemos os valores corrigidos pelo peso corporal (valor absoluto/peso corporal do animal). Outro importante índice de morfometria avaliado, fornecido pelo ecocardiograma, para caracterização da hipertrofia cardíaca (excêntrico/concêntrica) foi a espessura relativa da parede (ERP), que leva em conta a medida diastólica da parede do ventrículo esquerdo e a cavidade do ventrículo esquerdo, também em diástole, cuja fórmula é:  $2 \times PPDIA / VEDIA$  (PPDIA: parede posterior do VE em diástole; VEDIA: cavidade diastólica do VE). Qu e cols., em 2000 demonstraram ser este índice mais sensível em relatar alterações do VE na hipertensão do que outros, incluindo a massa ventricular esquerda. Tais medidas morfométricas, foram fornecidas pelo Modo-M, sempre guiado pelo modo bidimensional, conforme nos mostra a figura 4.

A função sistólica foi avaliada pelas frações de ejeção (FEj %), e de encurtamento (FEnc %) e velocidade de encurtamento circunferencial (VEC-circ/seg), cujas fórmulas estão a seguir:

$FEj = (VDF)-(VSF)/(VDF) \times 100\%$ , onde: VDF= Volume Diastólico Final; VSF= Volume Sistólico Final, sendo que o volume foi obtido a partir da seguinte fórmula:  $V = [7/(2.4+D)] \times D^3$  (Teichholz e cols., 1974)

$$FEnc = (VEDIA-VESIS/VEDIA) \times 100 \%$$

$VEC = (VEDIA-VESIS)/(VEDIA \times TE)$ , onde TE = tempo de ejeção

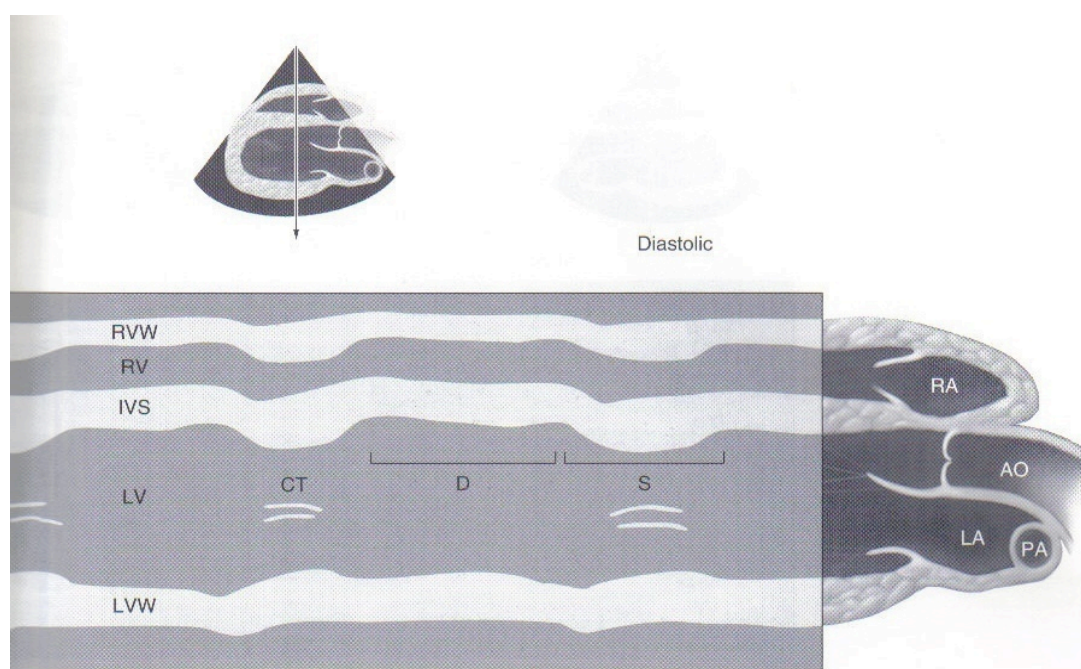
A função diastólica foi analisada utilizando-se os índices derivados da curva de velocidade de fluxo diastólico mitral e do fluxo sistólico da via de saída do ventrículo esquerdo obtidos pela técnica de doppler pulsátil. A curva de velocidade do fluxo diastólico foi obtida a partir da imagem apical quatro câmaras, posicionando-se o volume-amostra próximo à face ventricular da valva mitral (Figura 5). Foram determinadas: a) onda E – maior valor da velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular (enchimento rápido do ventrículo); b) onda A – maior valor da velocidade de fluxo telediastólico mitral (correspondente à contração atrial); c) relação E/A - razão entre a velocidade máxima da onda E e a velocidade máxima da onda A; d) tempo de desaceleração da onda E (DESAC.E) – tempo, em milissegundos (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 ventrículo esquerdo. Foi determinado o TRIV em ms, entre o final do fluxo sistólico na via de saída do ventrículo esquerdo e o início do fluxo diastólico mitral. O DESAC.E e o TRIV, posteriormente, foram corrigidos pela frequência cardíaca ( $DESAC.E_{CORR}$  e  $TRIV_{CORR}$ ), dividindo-se seus valores pela raiz quadrada dos respectivos intervalos R-R. A avaliação do doppler tecidual foi realizada com o posicionamento do volume-amostra ao nível do anel mitral no corte apical quatro câmaras, para a obtenção dos picos de

velocidade distólica máxima rápida (E') e lenta (A') das paredes septal e lateral do VE. Em seguida, obtivemos as razões dos picos E e A, tanto para a parede septal (E'/A's) quanto para a parede lateral do VE (E'/A'p).

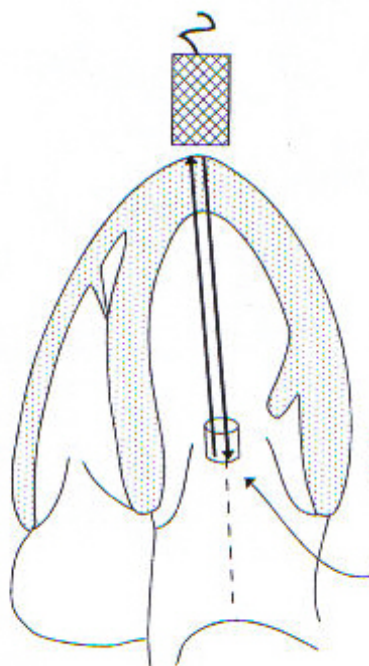
Para a obtenção do débito cardíaco, foi utilizada a seguinte fórmula:  $3.14 \times (D/2)^2 \times VTI \times FC$ , onde D = diâmetro aórtico, obtido no modo bidimensional, VTI = integral da velocidade do fluxo aórtico, obtido no estudo Doppler pulsátil da via de saída do VE e FC = frequência cardíaca, por intermédio dos intervalos R-R. Slama e cols. (2003) demonstraram uma correlação positiva com  $r^2 = 0,93$  entre esta metodologia e medidas invasivas de termodiluição para obtenção do débito cardíaco em ratos. No mesmo trabalho, outras fórmulas ecocardiográficas para obtenção do débito cardíaco, como a do Modo-M, por meio da medida de volume, também apresentaram boa correlação com medidas invasivas no trabalho em questão, porém não tão significativas como esta.

Todas as medidas seguiram as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia.





**Figura 5-** Modo-M do VE, guiado pelo modo bidimensional, com o cursor posicionado entre a válvula mitral e o músculo papilar, mostrando espessura diastólica e sistólica do septo-interventricular (IVS), cavidade do ventrículo esquerdo na diástole e na sístole (LV) e espessura diastólica e sistólica da parede posterior do ventrículo esquerdo (LVW).

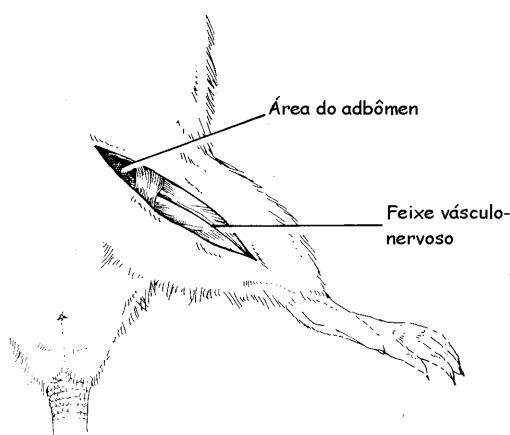


**Figura 6** – Corte apical 4 câmaras mostrando o posicionamento do volume amostra (seta) , próximo à face ventricular da valva mitral para avaliação do fluxo transmitral no estudo do Doppler pulsátil.

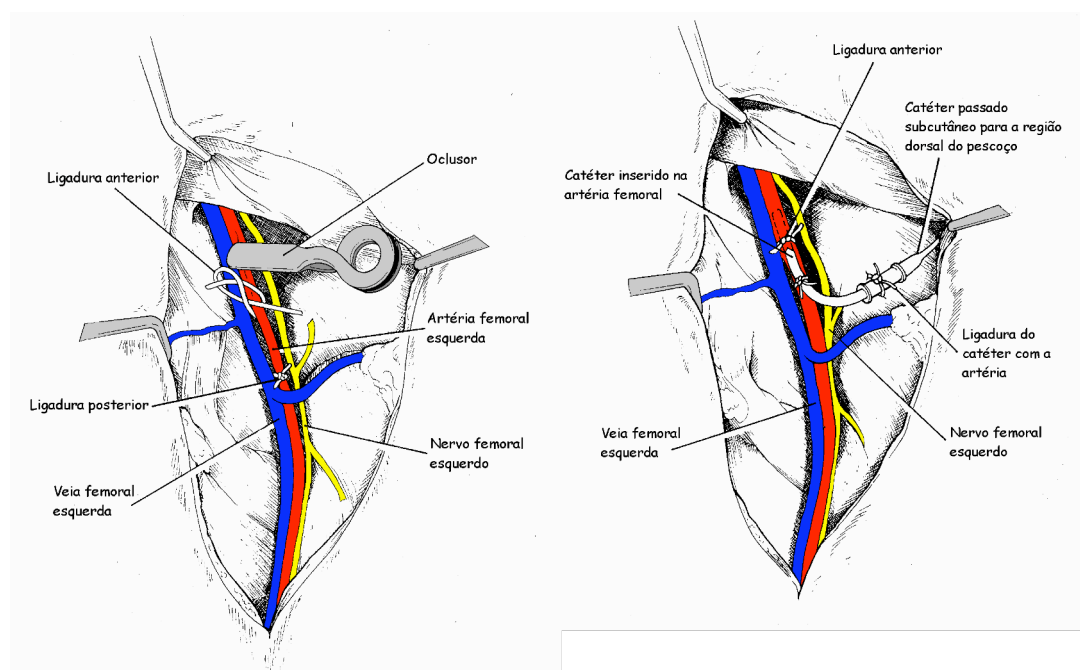
### 3.6.2 Canulação

No dia seguinte à avaliação ecocardiográfica, os animais foram anestesiados com ketamina ( $50 \text{ mg./kg}^{-1}$ ) e xilazina ( $10 \text{ mg./kg}^{-1}$ ) para colocação de cânulas de polietileno (PE-10, com diâmetro interno de 0,01 mm conectadas a uma peça de PE-50, com diâmetro interno de 0,05 mm). As cânulas foram preenchidas com soro fisiológico, e posicionadas no interior da artéria e veia femorais esquerdas para registro da PA, frequência cardíaca e administração de drogas, respectivamente. A extremidade a ser

conectada ao transdutor de pressão foi fechada com pinos de aço inoxidável. As cânulas foram introduzidas a partir de uma pequena incisão inguinal esquerda em direção ao feixe vâsculo-nervoso, as extremidades das cânulas de menor calibre (PE-10) foram introduzidas na luz da artéria e veia femurais (Figuras 7 e 8). 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, 60.000 U).



**Figura 7** – Sítio de dissecção para a cateterização da artéria femoral

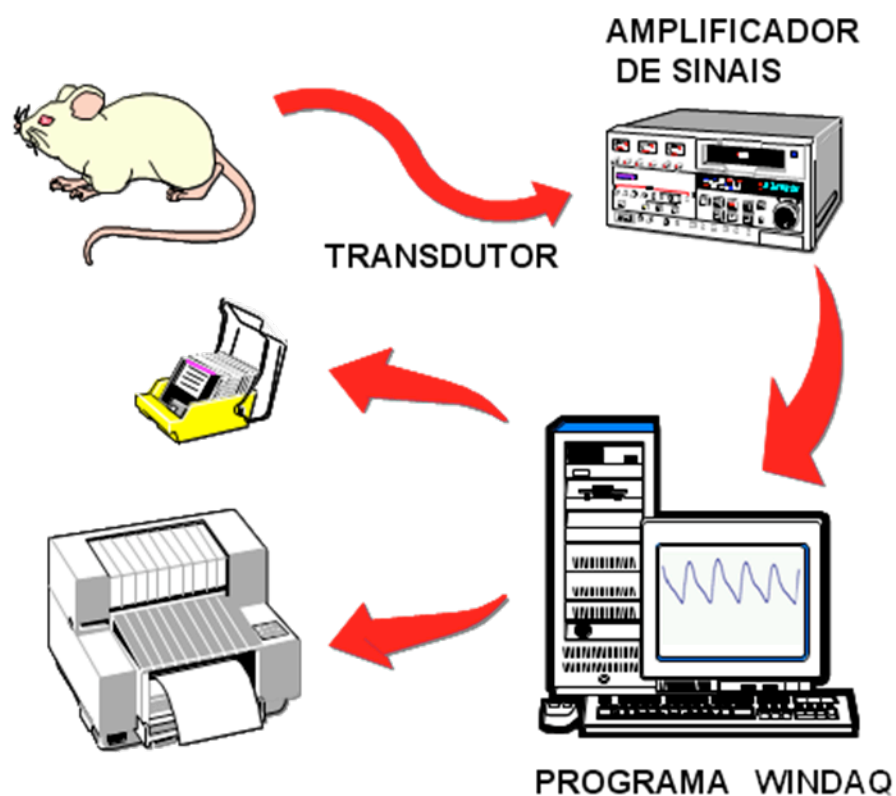


**Figura 8 – Isolamento da artéria femoral e inserção do cateter**

### 3.6.3 Medidas de pressão arterial e labilidade da PA

Vinte e quatro horas após a cirurgia de canulação, os registros de pressão 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 (P23 Db; Gould-Statham) 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 CODAS, com frequência de amostragem de 2000Hz por canal.

A análise dos sinais de pressão foi realizada utilizando-se um programa comercial associado ao sistema de aquisição (Figura 9). Este programa permitiu a detecção de máximos e mínimos da curva de pressão batimento a batimento, fornecendo os valores de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) pela integral da área sob a curva no tempo. A frequência cardíaca (FC) foi determinada a partir do intervalo entre dois picos sistólicos. As planilhas de dados obtidas foram analisadas em programa comercial para análise (Excel 5.0), onde se calcularam a média e o desvio padrão da PAM, PAS, PAD e FC para cada animal. A variabilidade da PAM foi calculada, utilizando-se a média dos desvios padrões de cada animal estudado. A variabilidade da PAM foi calculada, utilizando-se a média dos quadrados dos desvios de cada animal estudado.



**Figura 9-** Esquema do sistema de registro de Pressão Arterial

#### **3.6.4 Avaliação do Reflexo Pressorreceptor**

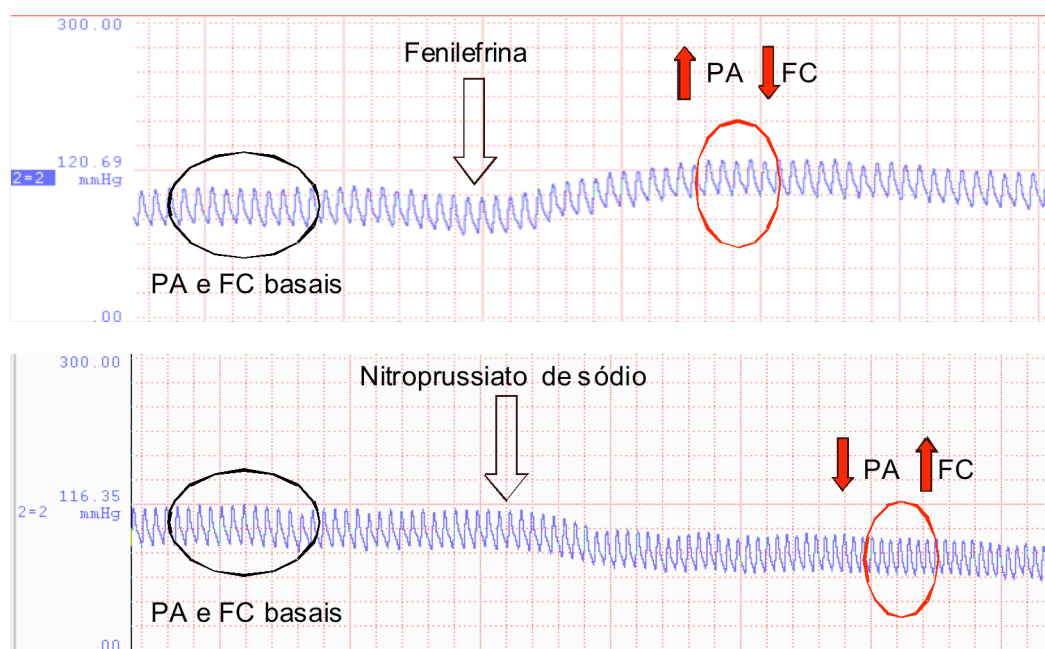
Após o registro de PA e os animais terem permanecido em condições de repouso por 15 minutos, a sensibilidade dos pressorreceptores foi testada através da infusão de fenilefrina e logo após, nitroprussiato de sódio.

A fenilefrina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), um potente estimulador  $\alpha_1$ , cuja ação predominante se dá nas arteríolas periféricas causando vasoconstrição, foi injetada em doses crescentes na

cânula da veia femoral. Tal fármaco foi utilizado, portanto, para causar aumento da pressão arterial, efeito que provoca bradicardia reflexa subsequente, comandada pelos pressorreceptores.

O efeito contrário, redução da pressão arterial com resposta taquicárdica, também comandada pelos pressorreceptores, foi provocado pela injeção de doses crescentes de nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), um potente vasodilatador tanto de arteríolas como de veias, cuja ação se dá por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3', 5'-guanosina monofosfato (GMP cíclico) na musculatura lisa dos vasos e outros tecidos.

Para avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores, o pico máximo ou mínimo da PAM foi reduzido dos valores de PAM do período controle. Da mesma forma, a variação máxima da frequência cardíaca foi reduzida dos valores de frequência cardíaca do período controle, imediatamente antes da infusão das drogas, para posterior quantificação das respostas. A sensibilidade baroreflexa foi avaliada pelo índice calculado através divisão da variação da FC pela variação da PAM.



**Figura 10:** Registro da pressão arterial e frequência cardíaca antes e após a administração de drogas vasoativas. Observe a resposta reflexa dos pressorreceptores

### 3.6.5 Análise Espectral e Espectral Cruzada

#### *Algoritmo Paramétrico Autorregressivo*

A decomposição de séries temporais de vários sinais como: intervalo de pulso (tacograma), pressão arterial sistólica (sistograma), pressão arterial diastólica (diastograma), atividade nervosa (neurograma), etc, são obtidas através da análise espectral. Com essa análise podemos obter os espectros com suas respectivas potências a partir de bandas de frequência pré-determinadas. As análises espectrais e espectrais cruzada serão realizadas pelo Algoritmo Paramétrico Autorregressivo. Esse algoritmo nos permite através de remodelamento matemático a obtenção dos



componentes espectrais a partir de frequências centrais presente no sinal desejado (p. ex. Intervalo de pulso, pressão arterial, atividade nervosa, etc). O modelo da ordem utilizado será o de *Akaike* e às potências espectrais serão apresentados em valores absolutos e normalizados. Estas serão integradas em duas faixas de frequência de interesse: frequências altas (HF) entre 0,75 e 3,0 Hz e frequências baixas (LF) entre 0,20 e 0,75 Hz.

### **3.6.6 Avaliação Do Controle Autônômico**

A modulação autonômica (simpática e parassimpática) foi avaliada, a partir do registro basal dos animais acordados, através de ferramenta de análise tempo-frequência da variabilidade do intervalo de pulso (IP) e da pressão arterial sistólica (PAS).

A variabilidade do IP e da PAS foi avaliada no domínio do tempo através da variância e no domínio da frequência usando o método de análise autoregressiva, como descrito anteriormente (Farah VM e cols. 2004; Malliani A e cols. 1991; Chen Y e cols. 2005; Joaquim LF e cols. 2004 e Dias DS e cols. 2002). Resumidamente, as séries temporais de IP e PAS foram divididas em segmentos de 200 batimentos com sobreposição de 50%; um espectro foi calculado para cada segmento de acordo com o critério de Levinson-Durbin, com o modelo de ordem escolhido de acordo com o critério de Akaike, na faixa entre 10-14. Os componentes oscilatórios foram quantificados em duas faixas de frequência de interesse: frequências altas (HF) entre 0,8 e 4 HZ e frequências baixas (LF) entre 0,06 e 0,15 Hz.

Segmentos que apresentem oscilações em muito baixa frequência ( $< 0.1$  Hz) que contribuíam para mais de 70% de toda a variabilidade foram considerados segmentos não estacionários e foram descartados do estudo.

### **3.7 Protocolo Experimental do Rim Isolado**

No presente estudo, foi utilizado o sistema de perfusão renal fechado baseado nos estudos desenvolvidos por Bowman and Maack (1974); Ross (1978); Pegg (1971); Hamilton et al. (1974) e modificado por Fonteles et al (1983); Lima et al (1992) (Figura 11 e 12), sobretudo pela introdução de um pulmão artificial.

O sistema de perfusão de rim isolado consiste de um conjunto de equipamentos (figura 11 e 12; tabela 1) que possibilita o estudo da fisiologia renal, pois o órgão é mantido funcional (urinando metabólitos processados ou não, a partir do perfusato fornecido), em ambiente extracorpóreo, por algumas horas a 37°C. Em condições de hipotermia o processo pode ser levado a termo por vários dias, como ocorre em transplantes experimentais ou clínicas.

O perfusato, substituto do sangue no sistema extracorpóreo, consiste de solução de Krebs-Henseleit modificada, contendo albumina bovina 6% fração V (Sigma). A solução tem grande importância na manutenção das funções renais no decorrer dos experimentos. Este sistema permite a coleta do perfusato, após ter passado pelo rim pela artéria renal, e da urina, formada após filtração do perfusato.

Para o procedimento de retirada do rim, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol veterinário 30%; Fontoveter, Brasil) na dose de 40 mg/kg endovenoso e acomodados em cama cirúrgica em decúbito ventral; após esta indução, são administrados 3,0 ml de manitol a 20%, por via intravenosa. Após o procedimento cirúrgico, o rim foi cuidadosamente removido e introduzido ao sistema de perfusão. Foi aguardado um período de 20-30 minutos para a adaptação renal às novas condições experimentais.

### **3.7.1 Protocolo Experimental**

Inicialmente era preparada uma solução de Krebs-Henseleit, concentrada a 20%, composta de 138g de NaCl (Sigma), 7g de KCl (Merck), 3,2g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Synth), 5,8g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Reagen) e 10g de uréia (Sigma), denominada solução estoque.

No tempo de 48h antes do experimento, separava-se 100ml desta solução e acrescentava-se 4,2g de  $\text{NaHCO}_3$  (Synth), 0,74g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma), 2g de glicose (Squibb) e 0,05g de penicilina G potássica cristalina (Squibb). Em seguida completava-se o volume para 2L com água bidestilada. Retirava-se, então, 300mL desta última solução, na qual adicionava-se albumina bovina (6%). Em seguida, era realizada a diálise, auxiliada por um homogeneizador, que tinha por objetivo retirar as substâncias contaminantes, como piruvato, citrato e lactato. Os 1700mL restantes eram usados como solução para a diálise, a qual era trocada com

24 horas. Após 48 horas de diálise, acrescentava-se 50mg de inulina. O pH da solução era ajustado entre os valores de 7,3 e 7,4.

Esta solução tem a seguinte composição em  $\mu\text{M}$ : 147 de  $\text{Na}^+$ ; 5 de  $\text{K}^+$ ; 2.5 de  $\text{Ca}^{+2}$ ; 2.0  $\text{Mg}^{2+}$ ; 25 de  $\text{HCO}_3^-$ ; 1.0 de  $\text{SO}_4^{-2}$  e 1.0 de  $\text{PO}_4^{-2}$ . O volume de perfusato utilizado em cada perfusão era de aproximadamente 100mL.

A duração dos experimentos é de 120 minutos, com um controle interno de 30 minutos e 90 para os testes hormonais. Pela ausência de dados da literatura foi feito um grupo controle de perfusão de rins provenientes de animais com glicemia superior a 200 mg/dl. Isso, por conseguinte gerou um controle externo.

Antes de cada experimento, o sistema (figura 12) foi cuidadosamente montado e calibrado. Após a colocação de solução salina no sistema, era sempre verificada a presença de qualquer vazamento, que quando encontrado, era rapidamente solucionado. Para a calibração, a solução salina aquecida a  $37^\circ\text{C}$  era coletada por um minuto em proveta milimetrada a cada velocidade da bomba (1, 1.5, 2, 2.5 e 3). Ao mesmo tempo eram também verificadas as medidas do fluxômetro e do manômetro de mercúrio. Entre cada mudança de velocidade da bomba esperavam-se aproximadamente cinco minutos para a adaptação do sistema. O objetivo da calibração era o de verificar o fluxo de perfusão frente à resistência do próprio sistema.

Durante a perfusão renal, a cada 10 minutos, amostras de perfusato e urina foram coletadas para medidas das funções renais e os cálculos fisiológicos mencionados adiante foram aplicados.

### **3.7.2 Análise dos parâmetros renais**

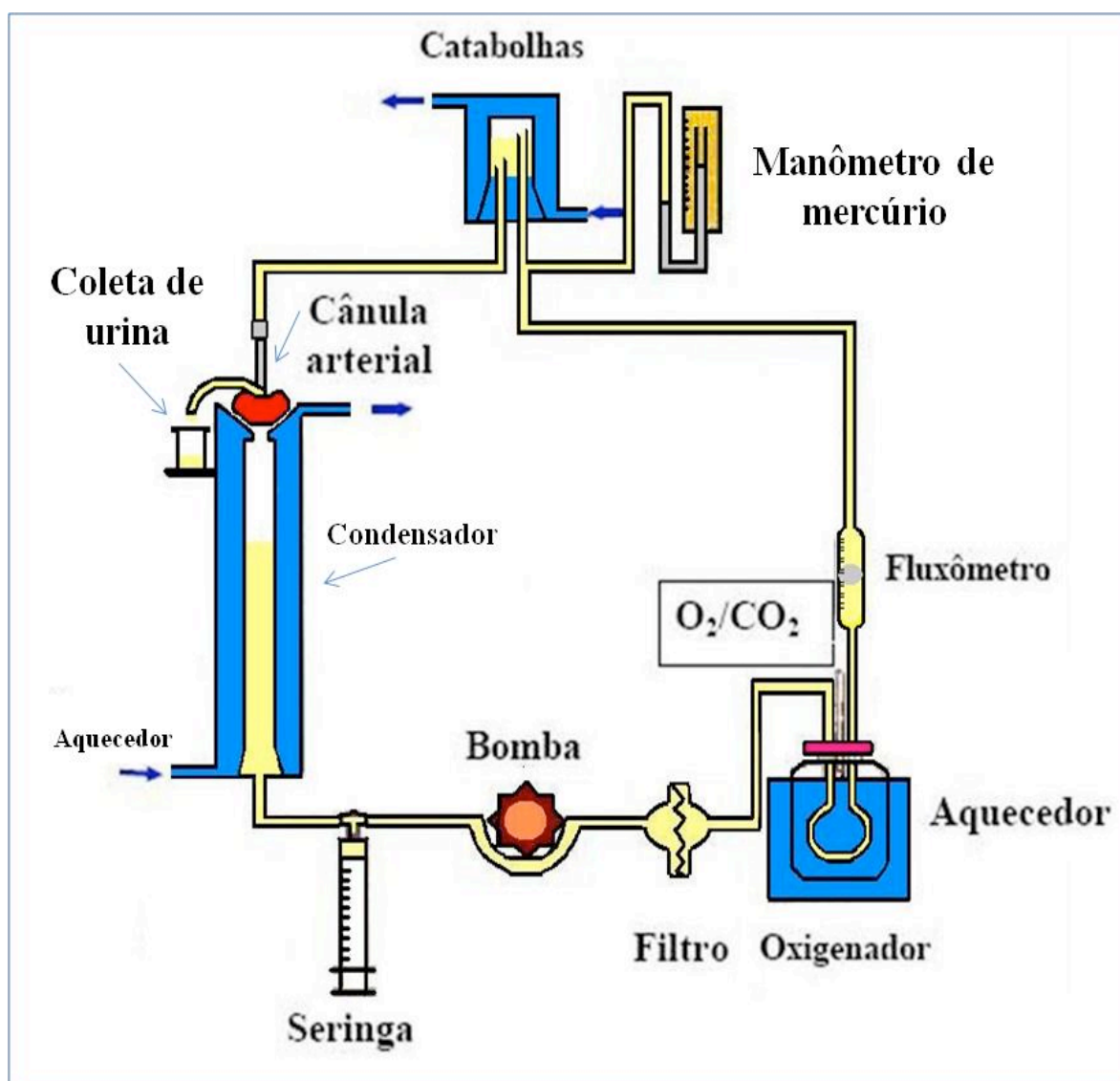
O ritmo de filtração glomerular foi determinado através da fórmula de clearance, de acordo com as descrições de Pitts, em 1971 e Martinez-Maldonado & Opava-Stitzer, em 1978. Também foram determinados o fluxo urinário e o clearance osmolar. O sódio e o potássio foram determinados por fotometria de chama. A osmolalidade das amostras foi medida em osmômetro de pressão de vapor da Advanced Instruments (Needham Heights, MA). A função distal de água foi avaliada através do clearance de água livre (Pitts, 1971 e Martinez-Maldonado & Opava-Stitzer, 1978).

### **3.7.3 Cálculo dos parâmetros renais**

Para a determinação dos parâmetros renais foram utilizadas as fórmulas abaixo. Todos os cálculos realizados para sódio foram repetidos para potássio e cloreto.

**Tabela 1** : Cálculo dos Parâmetros Renais.

PARÂMETROS	FÓRMULAS
<b>Pressão de perfusão (PP, mmHg)</b>	PP = dado obtido do manômetro de mercúrio
<b>Fluxo plasmático renal</b>  <b>(FPR, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)</b>	FPR = fluxo registrado a cada 10 min/intervalo de tempo x peso do rim.
<b>Fluxo Urinário (FU, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)</b>	FU = peso do volume urinário/peso do rim esquerdo / 10
<b>Ritmo de filtração glomerular</b>  <b>(RFG, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)</b>	RFG = $DOU_{in}/DOP_{in} \times FU$ , onde: $DOU_{in}$ = densidade ótica da inulina na urina; $DOP_{in}$ = densidade ótica da inulina no perfusato
<b>Resistência Vascular Renal</b>  <b>(RVR, mmHg.mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):</b>	RVR = $PP/FPR$



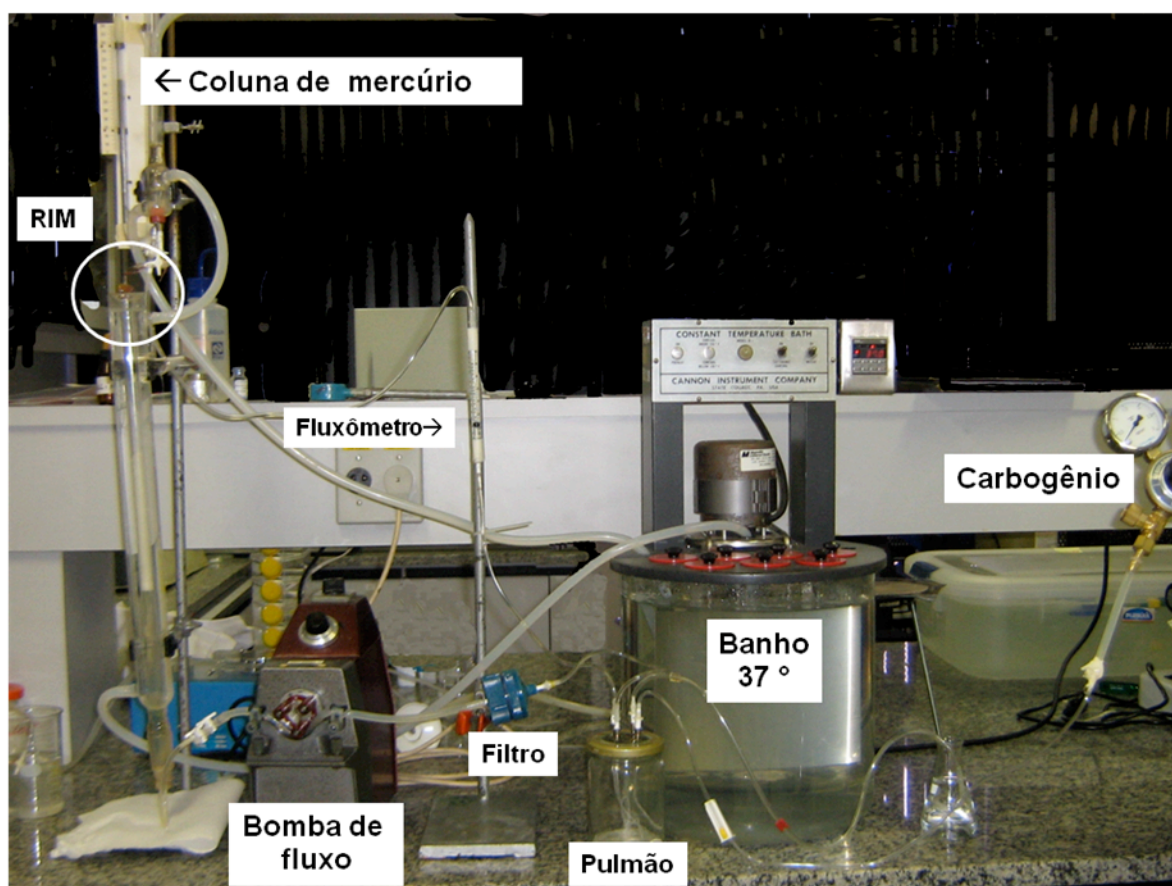
**Figura 11:** Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado de rato.

**Tabela 2:** Componentes do sistema de perfusão renal.

Condensador	Mantém aquecido o cilindro reto que comporta a solução perfusora
Coletor de urina	Recipiente para coleta da urina
Seringa	Ponto do sistema que permite a coleta do perfusato
Cânula arterial	Ponto de conexão entre o sistema e a artéria renal.
Bomba de perfusão (Watson-Marlow)	Funciona como o “coração” do sistema, gerando a força propulsora para distribuição da solução perfusora.
Fluxômetro	Mede o fluxo do perfusato em ml
Filtro (millipore, 47 mm de diâmetro e com poro de 4,5 $\mu\text{m}$ )	Filtra a solução perfusora, dificultando a passagem de células ou <i>debris</i> que casualmente permaneçam no rim após sua colocação no sistema.
Aquecedor: Banho-maria e Bomba aquecedora com termostato	Aquecimento da solução perfusora, mantendo e a temperatura do sistema constante em 37° C.



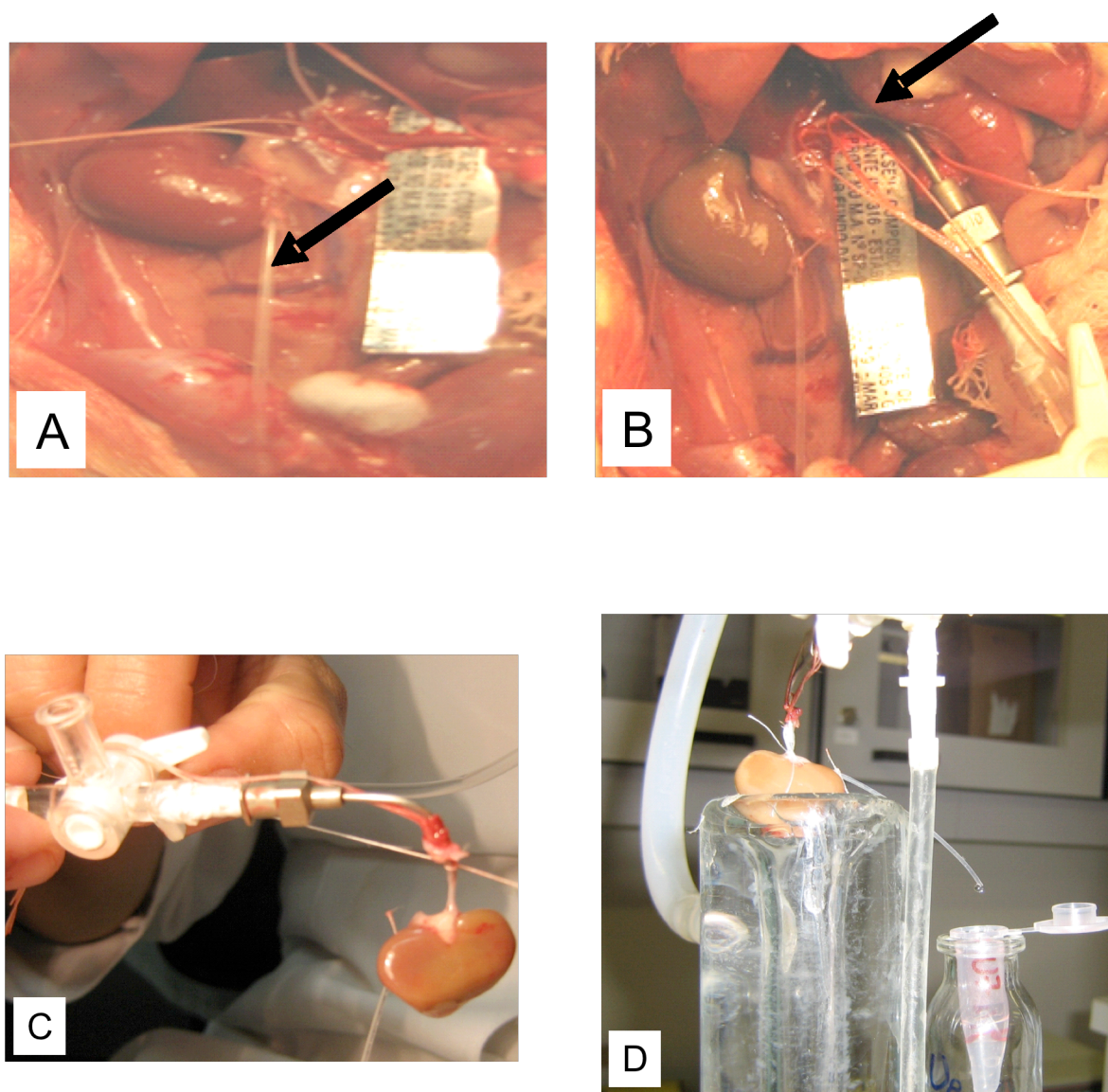
Oxigenador ou pulmão artificial do tipo silástico	Promove as trocas gasosas (95% de O <sub>2</sub> e 5% de CO <sub>2</sub> )
Manômetro de mercúrio em U	Mede a pressão de perfusão
Catabolhas	Retira as bolhas de ar geradas no sistema, evitando que entrem no rim e causem embolia.



**Figura 12:** Sistema de perfusão renal.

**Tabela 3:** Procedimento para retirada do rim direito.

Administração endovenosa de 3,0 ml de manitol a 20% através da veia femoral da pata esquerda do animal. O manitol é um potente diurético e foi utilizado para aumentar o volume urinário e auxiliar na visibilidade e canulação do ureter;
Retirada da supra renal do rim direito;
Amarração da porção distal do ureter para permitir enchimento urinário;
Retirada da cápsula renal;
Dissecção da artéria mesentérica superior, para permitir o acesso indireto da artéria renal direita, evitando interrupção do fluxo sanguíneo e isquemia renal;
Canulação do ureter (cânula de polietileno PE50 estirada), para posterior coleta de urina;
Canulação da artéria mesentérica e acesso da artéria renal;
Início da perfusão renal com o perfusato do sistema extracorpóreo;
Retirada do rim direito e acoplamento no sistema de perfusão extracorpóreo.



**Figura 13:** Canulação do ureter (A), da canulação da artéria renal do rim direito (B), início da perfusão renal (C) e acoplamento do rim no sistema extracorpóreo (D).

### 3.8 Avaliação do Fluxo Sangüíneo – Método das Microesferas Coloridas

Para determinação do fluxo sangüíneo foram utilizadas microesferas coloridas amarelas (Dye-Trak microspheres, Triton Technology). As microesferas são compostas de polystyrene (98%) e divinilbenzeno (2%) tendo diâmetro de  $15,1 \pm 0,2 \mu\text{m}$  e concentração comercial de 3000 esferas/ml.

Após o registro de PA foi injetada uma solução contendo 300.000 esferas/180 $\mu\text{l}$  sonicadas durante 3 minutos imediatamente antes da infusão. Esta solução (180  $\mu\text{l}$ ) foi colocada em 75 cm de uma extensão de cateter P50 conectada a uma seringa de um ml com salina pré-aquecida (40°C) contendo Tween 80 (0,01%). A cânula posicionada na aorta abdominal foi conectada a uma seringa de um ml, pré-heparinizada, para retirada de sangue durante a infusão. Dez segundos, antes da injeção das esferas iniciou-se a retirada de sangue através de uma bomba de retirada a um fluxo de 0,5 ml/min que continua por 75 segundos. Foram injetadas 300.000 esferas (amarelas) no ventrículo esquerdo a um fluxo de 0,36 ml/min durante 50 segundos. Desta forma, os 180  $\mu\text{l}$  de solução contendo as microesferas foram injetadas nos primeiros 30 segundos.

O volume de sangue retirado foi repostado através do volume injetado durante a infusão das esferas e por um pequeno volume de salina (0,1-0,2 ml) injetado *in bolus* logo após o término do procedimento.

O animal foi sacrificado com uma overdose de pentobarbital sódico, injetado no peritônio e os tecidos foram retirados para análise (ventrículo esquerdo, ventrículo direito, rins direito e esquerdo, pulmões, gastrocnêmio e sóleus).

### **3.8.1 Digestão e processamento dos tecidos**

As amostras de sangue foram pesadas e colocadas em tubos de polipropilene de 15 ml. Foram centrifugadas a 2000g por 10 minutos e o plasma foi coletado para análise de insulina e glicose plasmáticas. Adicionaram-se 4 ml de um reagente de hemólise ao pellet e centrifugou-se durante 30 minutos a 2000g. O sobrenadante foi desprezado e colocaram-se 2 ml de hidróxido de sódio (2N), e levado ao banho (90°C) e seguindo o mesmo procedimento dos demais tecidos.

Os tecidos foram processados segundo técnica adaptada de Hakkinen et al, 1995. Os tecidos foram pesados (0,4 – 1,2 g) e colocados em tubo de polipropilene de 15 ml, previamente identificado. Após a adição de 4 ml de hidróxido de sódio (2N) os tubos foram tampados e colocados em banho à 90°C por aproximadamente 2 horas. As amostras foram agitadas a cada 15 minutos até a dissolução dos tecidos. Os tubos foram removidos do banho e foi adicionado 8 ml de Reagente de Digestão. As amostras foram misturadas por inversão (5x) e centrifugadas por 30 minutos à 2000g. Os sobrenadantes foram desprezados, adicionaram-se 10 ml de Reagente de Contagem, e as amostras foram novamente colocadas no banho (90°C) por aproximadamente 3 horas. Os tubos foram agitados a cada 20 minutos até

que não se observavam mais debris. Após, retirada do banho, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 2000g e o sobrenadante aspirado, permanecendo no tubo aproximadamente 100-200 $\mu$ l. Adicionou-se etanol absoluto (4°C), agitaram-se os tubos para lavagem das amostras e centrifugou-se por 15 minutos a 2000g (4°C). O etanol foi aspirado, permanecendo 100-200 $\mu$ l no fundo dos tubos. As amostras foram colocadas em estufa (56°C) overnight para evaporação.

### **3.8.2 Extração do corante e medidas de absorbância**

Para extração do corante, 250  $\mu$ l de dimetilformamida foi colocada em cada tubo. As amostras foram agitadas vigorosamente por 30 segundos e centrifugadas por 10 minutos à 2000g.

Coloca-se 200  $\mu$ l do sobrenadante em uma cubeta de quartzo de 180  $\mu$ l (Sigma) e realizou-se a leitura das absorbâncias no espectrofotômetro. Os picos dos espectros de absorbância das microesferas amarelas foram usados a uma largura de banda de luz <1,8 nm. A absorbância mínima aceitável foi de 0,02 AU para as amarelas. Absorbâncias menores que estas foram excluídas da análise.

### **3.8.3 Determinação do fluxo sanguíneo**

O volume de sangue coletado foi calculado dividindo o peso da amostra de sangue por 1,05 g/ml, a constante gravitacional específica do sangue. A constante de retirada do sangue (ml/min) foi determinada pela divisão do volume de sangue (ml) coletado pelo tempo (em minutos) de

retirada da amostra. Para cada infusão, o cociente da divisão da constante de retirada do sangue pela AU da amostra de sangue foi utilizado como base para calcular o fluxo para os tecidos:

$$Q_t = A_t (Q_s/A_s)$$

Onde,  $Q_t$  e  $Q_s$  são o fluxo para o tecido ou sangue, e  $A_t$  e  $A_s$  são as absorvâncias do tecido ou do sangue, respectivamente.

Os fluxos sangüíneos foram divididos pelo peso das amostras (g) para obter o fluxo em ml/min/g de tecido.

#### **3.8.4 Determinação do débito cardíaco**

O débito cardíaco, expresso em ml/min, foi calculado segundo a fórmula:

$$\frac{\text{Número total de microesferas injetadas (300.000)} \times \text{fluxo de referência (0,5ml/min)}}{\text{Número de microesferas no sangue}}$$

### **3.8.5 Determinação do índice cardíaco**

O índice cardíaco foi obtido pela divisão do débito cardíaco (ml/min) pelo peso corporal (Kg) do animal, sendo expresso em ml/min/Kg.

### **3.8.6 Determinação da resistência vascular sistêmica total**

A resistência vascular sistêmica total foi determinada pela divisão da pressão arterial média pelo débito cardíaco, sendo expresso em mmHg/ml/min.

## **3.9 Análise Estatística**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM. As médias são comparadas através de ANOVA de dois caminhos, sendo significativa se  $p < 0,05$ . Em caso de diferença significativa foi utilizado um teste post-hoc adequado. A correlação de Pearson foi usada para estudar as associações entre as variáveis.



## RESULTADOS

---

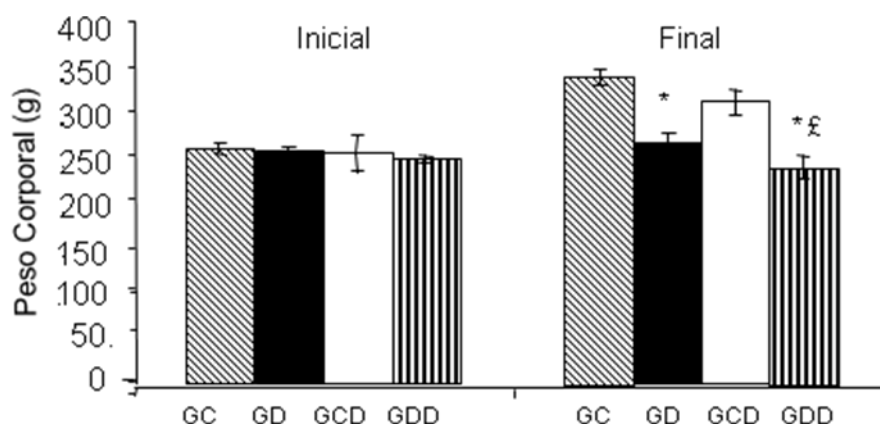
## **4. Resultados**

A seguir serão apresentados os resultados observado nos grupos controle (C, n=9), diabético (GD, n=11), desnervado (GCD, n=9) e desnervado diabético (GDD, n=8).

### **4. 1. Parâmetros metabólicos**

#### **4.1.1. Medida do peso corporal**

A Figura 14 representa o peso corporal inicial e final dos grupos GC, GD, GCD e GDD. Todos os animais estudados apresentaram o mesmo peso corporal no início do protocolo, entretanto, apesar de todos os animais terem aumentado seu peso durante o período do estudo, os grupos GD e GDD tiveram menor ganho de peso corporal durante as 4 semanas de protocolo em relação aos grupos GC e GCD.

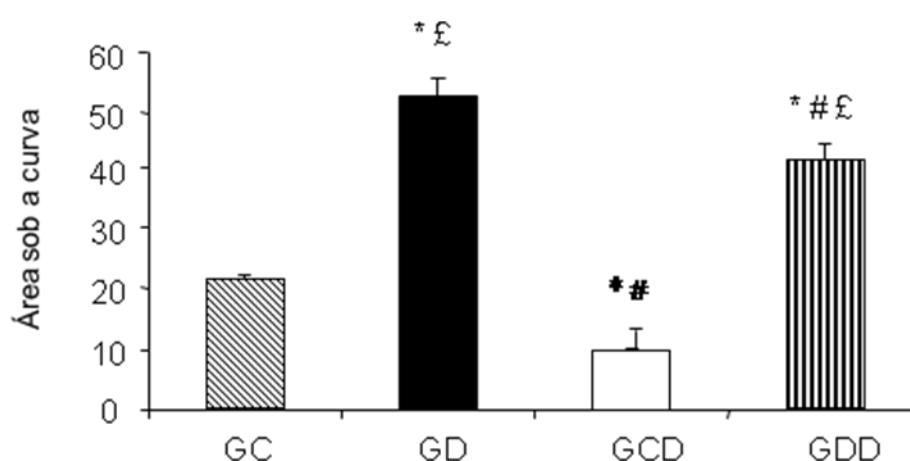


**Figura 14:** Peso corporal inicial e final dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD). \*  $p < 0,05$  vs. grupo controle; #  $p < 0,05$  vs. grupo diabético; £  $p < 0,05$  vs. grupo controle desnervado.

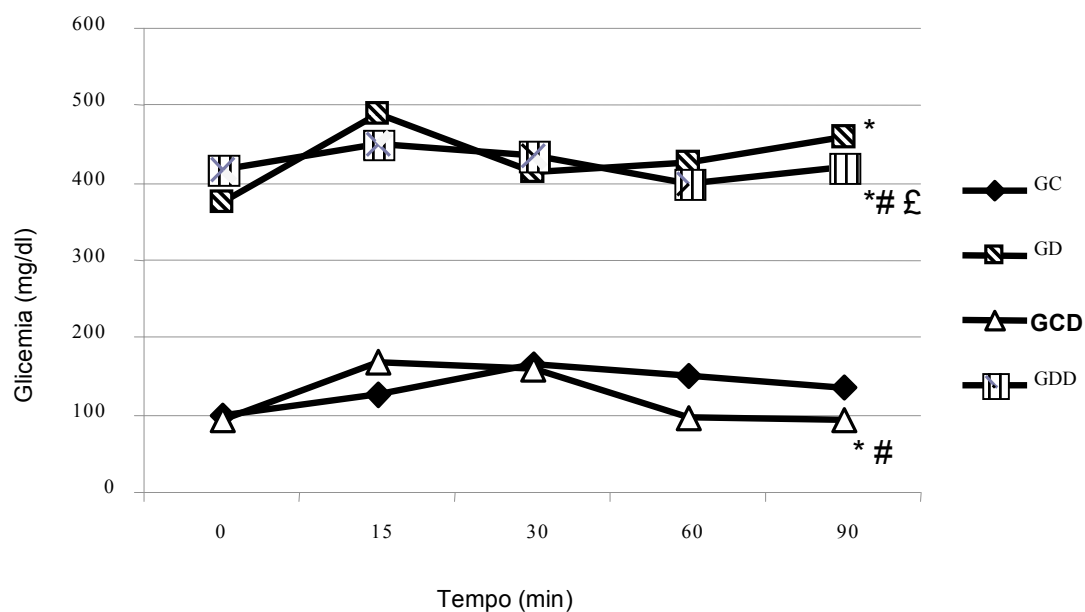
#### 4.1.2 Resposta à sobrecarga glicêmica

A figura 15 mostra a área sob a curva da resposta glicêmica nos grupos GC, GD, GCD e GDD após sobrecarga de glicose. Como podem ser observados, os grupos diabéticos apresentaram uma maior área quando comparados aos grupos controle, indicando assim uma intolerância maior a glicose, situação esta comumente associada ao estado diabetogênico. De forma interessante, os grupos submetidos à DSA apresentam uma melhor resposta para a sobrecarga glicêmica, o que pode ser visto com a menor área sob a curva de resposta após a injeção de glicose nesses grupos. A figura 16 representa a curva de resposta à injeção de glicose, nos tempos 0,

15, 30, 60 e 90 minutos. É importante ressaltar que os animais desnervados diabéticos ou não apresentam glicemia de jejum menor (GC  $101 \pm 2$ ; GD  $418 \pm 10$ , GCD  $92 \pm 3$ ;  $375 \pm 5$  mg/dL) quando comparados a seus respectivos controles.



**Figura 15:** Área sob a curva de resposta glicêmica após injeção intraperitoneal (ip) de glicose (1.5g/kg). dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD). \*  $p < 0,001$  vs. grupo controle; #  $p < 0,001$  vs. grupo diabético; £  $p < 0,001$  vs. grupo controle desnervado.



**Figura 16:** Curva da resposta glicêmica após injeção intraperitoneal (*ip*) de glicose (1.5g/kg). dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD). \*  $p < 0,001$  vs. grupo controle; #  $p < 0,001$  vs. grupo diabético; £  $p < 0,001$  vs. grupo controle desnervado .

#### 4.1.3. Avaliação da ingesta hídrica e excreção urinária (Gaiola Metabólica)

A Tabela 4 mostra o volume de água ingerido, volume urinário e composição da urina dos animais GC, GD, GCD e GDD. Os animais submetidos tanto à desnervação quanto à indução do diabetes, apresentaram aumento no consumo de água que foi acompanhado de aumento de volume urinário. Entretanto no grupo com a associação de SAD e DM (GDD) esse aumento foi menor quando comparado aos demais

grupos. Os animais diabéticos apresentaram valores aumentados de uréia, sódio, potássio, proteína e glicose, ressaltando que o grupo associação apresentou um nível menor de glicosúria e excreção de potássio quando comparado ao só diabético. Os animais desnervados também apresentaram aumento da excreção de sódio.

**Tabela 4:** Parâmetros avaliados na gaiola metabólica.

	Controle	Diabético	Desnervado	Desnervado Diabético
Água consumida (ml)	25 ± 1,5	93,5 ± 3,8*	34 ± 1**	118 ± 5,2**£
Volume Urina (ml)	7,9 ± 0,9	78,9 ± 6,4*	26 ± 6**	68 ± 12,8**£
Uréia (g/24h)	0,7 ± 0,04	1,7 ± 0,2*	0,7 ± 0,1	1,34 ± 0,2**£
Creatinina (g/24h)	0	0	0	0
Glicose (g/24h)	0	7,9 ± 1,0*	0	4,36 ± 1,7**£
Sódio (mEq/24h)	0,8 ± 0,07	1,5 ± 0,1*	1,8 ± 0,1**	1,84 ± 0,4*
Potássio (mEq/24h)	3,0 ± 0,2	5,6 ± 0,4*	3,81 ± 0,2**	4,64 ± 0,1**£
Proteína (g/24h)	0,015 ± 0,0005	0,03 ± 0,01*	0,03 ± 0,01*	0,03 ± 0,01*

Valores representam médias ± EPM. \* p < 0,05 vs. grupo controle; # p < 0,001 vs.

grupo diabético; £ p < 0,001 vs. grupo controle desnervado .

## 4.2. Parâmetros Ecocardiográficos

A tabela abaixo compara os valores de morfometria diastólica e de função sistólica dos grupos GC, GD, GCD e GDD. Nos parâmetros morfométricos, o septo interventricular (SIVDIA) mostrou-se menor nos grupos diabéticos quando comparados ao GC. A parede posterior do ventrículo esquerdo (PPDIA) mostrou-se diminuída somente no grupo diabético. Com relação ao tamanho da cavidade do ventrículo esquerdo na diástole (VEDIA), observou-se uma tendência a aumento em todos os grupos quando comparados ao controle. A massa do ventrículo esquerdo (MVE) foi menor no grupo diabético em relação ao controle e maior nos grupos submetidos à DSA quando comparados ao GC.

A função sistólica foi avaliada pela fração de ejeção (FE), na qual não foi observada diferença entre os grupos estudados. A função diastólica foi avaliada pelo tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) que foi maior no grupo diabético quando comparado ao controle. Já o grupo desnervado apresentou valores próximos ao do GC. Entretanto, o grupo desnervado diabético apresentou valores menores de TRIV quando comparado aos animais apenas diabéticos.

**Tabela 5:** Parâmetros ecocardiográficos de morfometria diastólica e de função cardíaca (sistólica e diastólica) dos ratos controles, diabéticos, desnervados e desnervados diabéticos.

	Controle	Diabético	Desnervado	Desnervado Diabético
SIVDIA (cm)	0,140 ± 0,01	0,100 ± 0,01*	0,130 ± 0,03	0,090 ± 0,01* £
PPDIA (cm)	0,14 ± 0,01	0,09 ± 0,01*	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,01
VEDIA (cm)	0,63 ± 0,07	0,73 ± 0,06	0,75 ± 0,05	0,69 ± 0,07
MVE (g)	0,48 ± 0,09	0,40 ± 0,03	1,13 ± 0,07* #	0,96 ± 0,10* #
FE (%)	0,74 ± 0,5	0,69 ± 0,5	0,76 ± 0,02	0,78 ± 0,18
TRIV (ms)	32 ± 4,4	41 ± 5	32 ± 5,2	28 ± 2,2#

Valores representam médias ± EPM. \* p < 0,001 vs. grupo controle; # p < 0,001 vs. grupo diabético; £ p < 0,001 vs. grupo controle desnervado.

### 4.3. Medida direta da pressão arterial e da frequência cardíaca

As medidas diretas dos sinais de pressão arterial demonstraram diminuição da PAD, PAS, PAM e FC nos grupos GD e GDD em comparação aos grupos GC e GCD. Além disso, os animais do GDD apresentaram uma redução adicional nos valores de PAD e PAM quando comparados aos animais do GD. Observando-se os valores de PA e FC do grupo desnervado nota-se uma semelhança do valor destas variáveis nestes animais em relação ao grupo controle (Tabela 6).



**Tabela 6:** Pressão Arterial diastólica (PAD), sistólica (PAS) média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado Diabético (GDD).

	Controle	Diabético	Desnervado	Desnervado Diabético
PAD (mmHg)	95,6 ± 2	81,7 ± 1* £	91,7 ± 2 # £	73,9 ± 1,6 * # £
PAS (mmHg)	125,6 ± 2	110,6 ± 1 * £	122,4 ± 2 #	105,7 ± 2,1 * £
PAM (mmHg)	108 ± 2	96,1 ± 1 * £	106,1 ± 2 # £	88,9 ± 1,8 * # £
FC (Bpm)	355 ± 7	299 ± 22 * £	357 ± 15 #	281 ± 15 * £

Valores representam média ± EPM. \* p < 0,001 vs. grupo controle; # p < 0,001 vs. grupo diabético; £ p < 0,001 vs. grupo controle desnervado.

#### 4.4 Avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores

Na tabela abaixo se pode verificar a sensibilidade barorreflexa dos grupos GC, GD, GCD, GDD. Os animais diabéticos apresentaram um prejuízo na sensibilidade barorreflexa avaliada pelas respostas de bradicardia e de taquicardia reflexas (vs. grupo C) induzidas por aumentos e quedas da PA, respectivamente. Os animais submetidos à DSA apresentaram a abolição do reflexo, como esperado. Vale ressaltar que mesmo diante do quadro de ausência do reflexo, os animais desnervados e

diabéticos mostram um reflexo residual ainda menor dentre todas as respostas avaliadas.

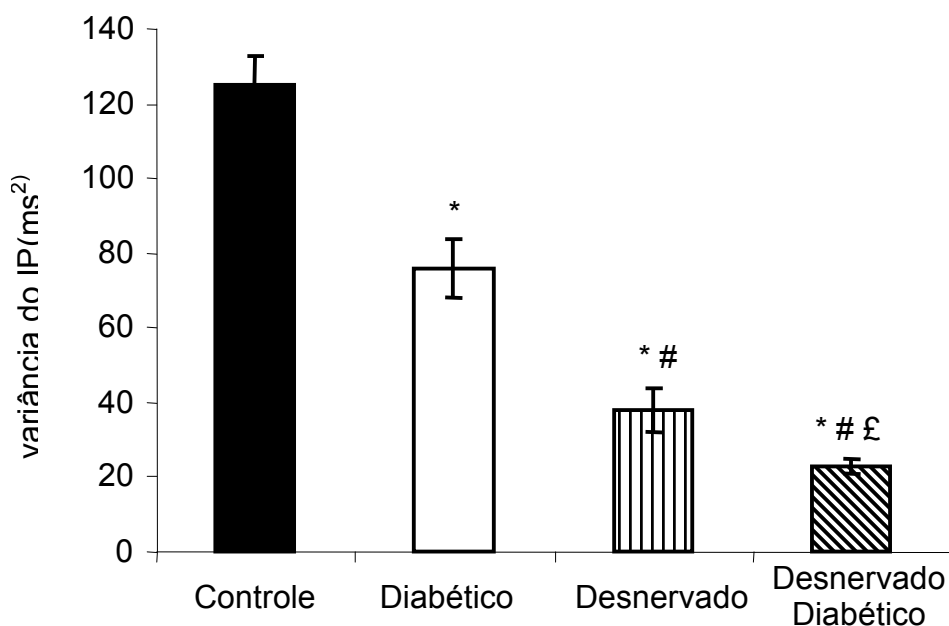
**Tabela 7:** Sensibilidade barorreflexa nos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado Diabético (GDD).

	<b>Resposta de Bradicardia (bpm/mmHg)</b>	<b>Resposta de Taquicardia (bpm/mmHg)</b>
<b>Controle</b>	-1,51 ± 0,1	3,0 ± 0,2
<b>Diabético</b>	-1,14 ± 0,1 * £	2,20 ± 0,1 * £
<b>Desnervado</b>	- 0,12 ± 0,1 * #	0,40 ± 0,1 *#
<b>Desnervado Diabético</b>	- 0,07 ± 0,05 * # £	0,20 ± 0,1 * # £

Valores representam média ± EPM. \* p < 0,001 vs. grupo controle; # p < 0,001 vs. grupo diabético; £ p < 0,001 vs. grupo controle desnervado.

#### 4.5 Avaliação da modulação autonômica cardíaca

A variância do intervalo de pulso cardíaco (IP) foi menor nos grupos GD ( $76 \pm 8 \text{ ms}^2$ ), GCD ( $38 \pm 6 \text{ ms}^2$ ) e GDD ( $23 \pm 2 \text{ ms}^2$ ) em comparação ao grupo controle ( $125 \pm 18 \text{ ms}^2$ ) (Figura 17).



**Figura 17:** A variância do intervalo de pulso cardíaco (IP) foi menor nos grupos Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD) em comparação ao grupo controle (GC). \*  $p < 0,001$  vs. grupo controle; #  $p < 0,001$  vs. grupo diabético; £  $p < 0,001$  vs. grupo SAD.

A avaliação pela análise espectral da banda de baixa frequência (LF) do tacograma, considerado um índice da modulação do simpático para o coração, estava reduzida nos grupos GD e GDD quando comparados ao grupo C, embora o GCD apresente uma tendência à redução desta variável. Foi observado um aumento da banda de alta frequência (HF), considerada um índice de modulação vagal cardíaco, no grupo diabético e desnervado diabético, embora o GCD apresente uma tendência a aumento quando comparado ao GC. Com relação ao balanço simpato-vagal (LF/HF) verificou-se uma marcada diminuição nos animais diabéticos associados ou não a desnervação sinoaórtica (Tabela 8).

**Tabela 8:** Análise espectral da banda de baixa (LF) e de alta (HF) frequência do tacograma e relação LF/HF nos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado Diabético (GDD).

	<b>% LF</b>	<b>% HF</b>	<b>LF/HF</b>
<b>Controle</b>	31,5 ± 4	68,5 ± 4	0,41 ± 0,14
<b>Diabético</b>	21,1 ± 3*	78,9 ± 3*	0,27 ± 0,06*
<b>Desnervado</b>	25,8 ± 4,7	74,2 ± 4,7	0,39 ± 0,10
<b>Desnervado Diabético</b>	20,5 ± 5,6*	79,5 ± 5,5*	0,25 ± 0,17*

Valores representam médias ± EPM. \* p < 0,05 vs. grupo controle; # p < 0,05vs. grupo diabético; £ p < 0,05vs. grupo controle desnervado.

Na variância da PAS observou-se uma grande queda no GD quando comparado ao GC. No grupo submetido à desnervação sino-aórtica, observou-se um aumento da variância decorrente da perda do reflexo baroreceptor. Apesar disso, os animais desnervados diabéticos mostraram uma atenuação desse aumento causado pela perda do barorreflexo. A avaliação pela análise espectral da banda de baixa frequência (LF) da PA, considerado um índice da modulação do simpático para a vasculatura, mostrou uma redução em todos os grupos quando comparados ao GC. A associação do diabetes com a desnervação levou a uma redução ainda

maior da banda de baixa frequência quando comparada aos grupos com a presença isolada desses fatores. A banda de alta frequência (HF) do sistograma mostrou-se diminuída nos grupos diabéticos (Tabela 9).

**Tabela 9:** Variância da pressão arterial sistólica (PAS), banda de baixa (LF) e de alta (HF) frequência do sistograma nos grupos controle (C), diabético (GD), desnervado (GCD) e desnervado diabético (GDD).

	<b>Variância PAS (mmHg<sup>2</sup>)</b>	<b>LF (mmHg<sup>2</sup>)</b>	<b>HF (mmHg<sup>2</sup>)</b>
<b>Controle</b>	29 ± 2	6,7 ± 2,1	1,8 ± 0,2
<b>Diabético</b>	10 ± 2,6*	1,6 ± 0,4*	1,3 ± 0,2*
<b>Desnervado</b>	46 ± 10*#	2,6 ± 0,5*#	1,5 ± 0,18
<b>Desnervado Diabético</b>	27 ± 9#£	0,63 ± 0,1*#£	1,05 ± 0,15*£

Valores representam média ± EPM. \* p < 0,001 vs. grupo controle; # p < 0,001 vs. grupo diabético; £ p < 0,001 vs. grupo controle desnervado.

#### 4.6 Avaliação no Sistema de Rim Isolado: Perfusão Renal

##### Extracorpórea.

Dentre os parâmetros que podem ser calculados fixaram-se, para fins de avaliação em todos os grupos, os seguintes parâmetros renais:

<b>PARÂMETROS RENAI AVALIADOS NA PERFUSÃO DE RIM ISOLADO:</b>
<b>Pressão de Perfusão (PP, mmHg)</b>
<b>Resistência Vascular Renal (RVR, mmHg.mL/g/min)</b>
<b>Fluxo Urinário (FU, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)</b>
<b>Ritmo de filtração glomerular (RFG, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)</b>
<b>Fluxo plasmático renal (FPR, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)</b>

##### 4.6.1 Pressão de Perfusão

Como pode ser demonstrada na tabela 10, a pressão de perfusão (PP) se manteve estável durante os 120 minutos do protocolo nos animais do grupo GC, GCD e GDD. Entretanto, no grupo GD ocorreu um aumento gradativo e significativo na pressão de perfusão durante os 120 minutos do protocolo experimental.

Houve um aumento significativo na pressão de perfusão dos animais diabéticos (GD) quando comparado com os animais controle (GC) ( $p=0,007$ ).

**Tabela 10:** Pressão de perfusão nos rins dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD)..

Grupos Experimentais	Tempo de coleta (minutos)			
	30	60	90	120
<b>Controle</b>	114 ± 8,0	114 ± 7,0	117 ± 4,4	117 ± 5,0
<b>Diabético</b>	120 ± 11,0	126 ± 9,4	136 ± 5,8*	141 ± 6,0*
<b>Desnervado</b>	107 ± 4,5	112 ± 5,1	112 ± 5,5#	118 ± 5,3#
<b>Desnervado diabético</b>	113 ± 4,0	115 ± 4,4	125 ± 4,3	122 ± 5,3

Pressão de Perfusão (PP, mmHg). Valores representam médias ± EPM. \* p < 0,05 vs. grupo controle; # p < 0,05 vs. grupo diabético; £ p < 0,05 vs. grupo controle desnervado.

#### 4.6.2 Resistência Vascular Renal

Como pode ser observada na tabela 11, a resistência vascular renal (RVR) se manteve estável durante os 120 minutos do protocolo nos animais GC e GCD. Entretanto, nos grupos GD e GDD observaram-se um aumento significativo na resistência vascular renal durante os 120 minutos do protocolo experimental.

Houve um aumento importante na resistência vascular renal dos animais diabéticos e diabéticos desnervados quando comparados com os animais controles (p=0,03).

**Tabela 11:** Resistência vascular renal nos dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD)...

<b>Tempo de experimento (minutos)</b>				
<b>Grupos</b>	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>90</b>	<b>120</b>
<b>Experimentais</b>				
<b>Controle</b>	4,3 ± 0,6	4,1 ± 0,4	4,2 ± 0,3	4,4 ± 0,4
<b>Diabético</b>	7,3 ± 1,4*	8,1 ± 1,4*	9,4 ± 1,8*	11,5 ± 2,0*
<b>Desnervado</b>	3,6 ± 0,2	3,7 ± 0,2#	3,8 ± 0,3#	4,1 ± 0,3#
<b>Desnervado diabético</b>	6,6 ± 1,8*	6,3 ± 1,5*	7,2 ± 1,8*	7,0 ± 1,4*

Resistência Vascular Renal (RVR, mmHg.mL/g/min). Valores representam médias ± EPM.

\* p < 0,05 vs. grupo controle; # p < 0,05 vs. grupo diabético; £ p < 0,05 vs. grupo controle desnervado.

#### 4.6.3 Fluxo Urinário

Como pode ser concluído na tabela 12, o fluxo urinário (FU) se manteve estável durante os 120 minutos do protocolo nos animais GC. Entretanto, no grupo GD observou-se um aumento gradativo no fluxo urinário chegando-se aos valores máximos aos 120 minutos do protocolo experimental. Já nos animais do grupo GCD observou-se uma redução do



fluxo urinário a qual se manteve estável ao longo do protocolo. A mesma redução pode ser vista no grupo GDD embora tenha ocorrido um aumento no fluxo urinário ao longo do protocolo, como observado nos animais do grupo GD.

**Tabela 12:** Fluxo urinário dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD).

<b>Tempo de coleta (minutos)</b>				
<b>Grupos Experimentais</b>	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>90</b>	<b>120</b>
<b>Controle</b>	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01
<b>Diabético</b>	0,09 ± 0,02*	0,15 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,27 ± 0,07
<b>Desnervado</b>	0,07 ± 0,01*	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01#	0,07 ± 0,01#
<b>Desnervado diabético</b>	0,05 ± 0,01*	0,07 ± 0,02*#	0,08 ± 0,02#	0,08 ± 0,02#

Fluxo Urinário (FU, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>). Valores representam médias ± EPM. \* p < 0,05 vs. grupo controle; # p < 0,05 vs. grupo diabético; £ p < 0,05 vs. grupo controle desnervado.

#### 4.6.4 Ritmo de Filtração Glomerular

Como pode ser deduzido da tabela 13, o ritmo de filtração glomerular (RFG) se manteve estável durante os 120 minutos do protocolo nos animais

GC. Entretanto, no grupo GD observou-se aumento gradativo no RFG durante os 120 minutos do protocolo experimental. Os animais dos grupos GCD e GDD apresentaram uma tendência à diminuição do RFG ao longo do protocolo experimental.

**Tabela 13:** Ritmo de filtração glomerular dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD).

Grupos Experimentais	Tempo de coleta (minutos)			
	30	60	90	120
<b>Controle</b>	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,01
<b>Diabético</b>	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,02*
<b>Desnervado</b>	0,5 ± 0,02	0,4 ± 0,01*	0,3 ± 0,01#	0,3 ± 0,01*#
<b>Desnervado diabético</b>	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,01#£	0,2 ± 0,01#	0,2 ± 0,01*#£

Ritmo de filtração glomerular (RFG, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>). Valores representam médias ± EPM. \* p

< 0,05 vs. grupo controle; # p < 0,05 vs. grupo diabético; £ p < 0,05 vs. grupo controle

desnervado.

#### 4.6.5 Fluxo Plasmático Renal

Como pode ser deduzido da tabela 14, o fluxo plasmático renal (FPR) se manteve estável durante os 120 minutos do protocolo nos animais GC. Entretanto, nos grupos GD e GCD observaram-se um aumento no RFG o qual se manteve aumentado durante os 120 minutos do protocolo experimental. Já no GDD observou-se uma redução no RFG em todos os 120 minutos analisados.

**Tabela 14:** Fluxo plasmático renal dos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado diabético (GDD).

Grupos Experimentais	Tempo de coleta (minutos)			
	30	60	90	120
Controle	28±1,8	28±1,7	27±1,5	24±1,4
Diabético	33 ±2,5	33 ±2,7	33 ±2,7	33 ±2,7
Desnervado	33± 1,7	33± 1,8	33± 2,3	32± 2,0
Desnervado diabético	20± 1,2*#£	20± 1,2*#£	20± 1,2*#£	22± 1,3

Fluxo Plasmático Renal (FPR, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>). Valores representam médias ± EPM. \* p < 0,05 vs. grupo controle; # p < 0,05 vs. grupo diabético; £ p < 0,05 vs. grupo controle desnervado.

#### 4.7 Fluxos Sanguíneos Regionais

Os fluxos sanguíneos analisados nesse protocolo (coronariano, pulmonar, renal e muscular) apresentaram-se reduzidos em todos os grupos experimentais quando comparados ao GC. O grupo submetido à DSA mostrou uma redução mais acentuada em todos os fluxos sanguíneos estudados. Entretanto, quando comparamos os grupos desnervados, pode-se notar que a associação do diabetes com a desnervação resultou em uma menor redução dos fluxos sanguíneos cardíaco, renal e muscular (gastrocnêmio).

**Tabela 15:** Análise do fluxo sanguíneo regional nos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado Diabético (GDD).

	CORAÇÃO	PULMÃO	RINS	GASTROCNÊMIO	SÓLEO
Controle	3,4 ± 0,6	1,31 ± 0,11	3,45 ± 0,2	0,25 ± 0,06	1,5 ± 0,1
Diabético	2,4 ± 0,6	1,00 ± 0,04*	2,24 ± 0,5*	0,31 ± 0,1	0,91 ± 0,4*
Desnervado	1,6 ± 0,3*#	0,82 ± 0,03*#	1,40 ± 0,2*#	0,10 ± 0,02*#	0,84 ± 0,2*#
Desnervado Diabético	2,1 ± 0,1*£	0,88 ± 0,05*#	1,84 ± 0,4*#£	0,18 ± 0,04*#£	0,88 ± 0,2*

Fluxo Sanguíneo regional (ml/min/g). Valores representam média ± EPM. \* p < 0,05 vs.

grupo controle; # p < 0,05 vs. grupo diabético; £ p < 0,05 vs. grupo controle desnervado.

#### 4.8 Resistências Vascular Periférica Total e Regional

A resistência vascular periférica total encontra-se aumentada em todos os grupos analisados com um aumento maior nos grupos diabéticos. Ao analisarmos as resistências regionais observamos um aumento na resistência vascular cardíaca, pulmonar, renal e muscular em todos os grupos, entretanto a DSA quando não associada ao diabetes, potencializou esse aumento, as únicas exceções foram observadas nos rins e no gastrocnêmio do grupo associação onde o diabetes não atenuou o aumento observado.

**Tabela 16:** Análise da resistência vascular periférica total nos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado Diabético (GDD).

	RVPT
Controle	1,02 ± 0,05
Diabético	1,52 ± 0,15*
Desnervado	1,27 ± 0,10*
Desnervado Diabético	1,71 ± 0,14*£

Resistência vascular periférica total e regional (mmHg/ml/min ). Valores representam médias ± EPM. \* p < 0,05 vs. grupo controle; # p < 0,05 vs. grupo diabético; £ p < 0,05 vs. grupo controle desnervado.

**Tabela 17:** Análise da resistência vascular regional nos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado Diabético (GDD).

	CORAÇÃO	PULMÃO	RINS	GASTROCNÊMIO	SÓLEO
Controle	35 ± 1,8	82 ± 4	31 ± 1,4	432 ± 20	72 ± 4
Diabético	40 ± 1,4	96 ± 5*	42 ± 1,8*	309 ± 17*	105 ± 5*
Desnervado	66 ± 2,6*#	129 ± 10*#	75 ± 5,4*#	1060 ± 38*#	126 ± 6*#
Desnervado Diabético	41 ± 1,8*£	100 ± 8*£	48 ± 1,7*#£	488 ± 21*#£	100 ± 4*£

Resistência vascular periférica total e regional (mmHg/ml/min). Valores representam médias ± EPM. \* p < 0,05 vs. grupo controle; # p < 0,05 vs. grupo diabético; £ p < 0,05 vs. grupo controle desnervado.

#### 4.9 Débito e Índice Cardíaco

O débito cardíaco mostrou-se reduzido em todos os grupos estudados, em especial no grupo desnervado diabético, quando comparados com o GC. Contudo quando comparamos o DC entre os grupos específicos, observamos que os grupos diabéticos apresentam uma maior redução do que a observada no grupo somente desnervado; e que quando há uma comparação entre os grupos diabéticos, o desnervado diabético é o que apresenta a pior avaliação.

Com relação ao índice cardíaco, também observamos uma redução em todos os grupos, com uma redução maior nos grupos diabéticos sendo

que a desnervação não foi capaz de atenuar essa redução no grupo desnervado diabético.

**Tabela 18:** Análise do débito cardíaco e do índice cardíaco nos grupos Controle (GC), Diabético (GD), Desnervado (GCD) e Desnervado Diabético (GDD).

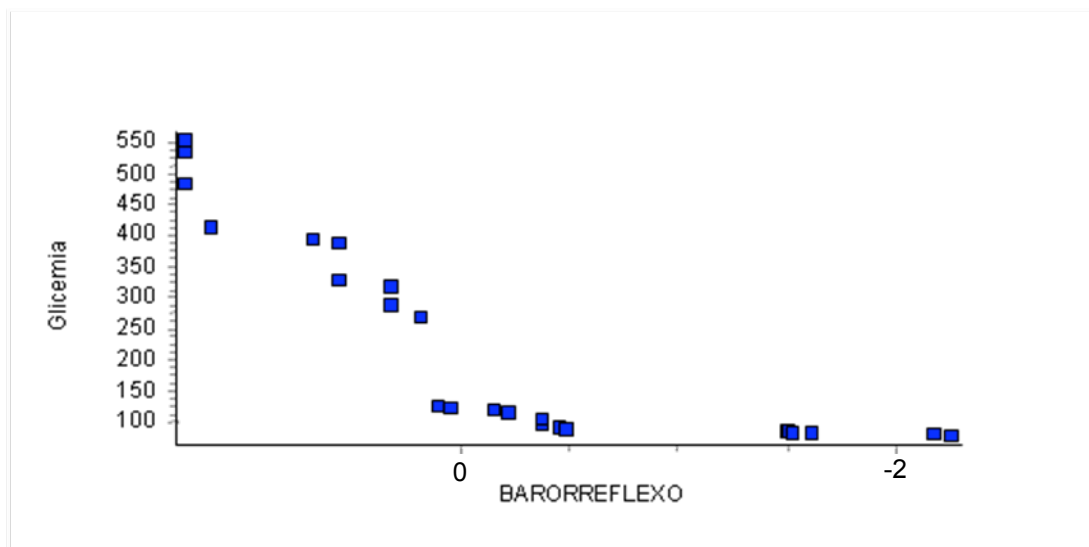
	DÉBITO	ÍNDICE
	CARDÍACO (ml/min)	CARDÍACO (ml/min/Kg)
Controle	111 ± 5,4	320 ± 9,7
Diabético	63 ± 3,8*	240 ± 7,8*
Desnervado	85 ± 5,1*#	270 ± 8,1*#
Desnervado Diabético	55 ± 1,8*#£	230 ± 5,4*£

Valores representam média ± EPM. \* p < 0,05 vs. grupo controle; # p < 0,05 vs. grupo diabético; £ p < 0,05 vs. grupo controle desnervado.

## 5. Correlações

A figura abaixo mostra a correlação entre os níveis glicêmicos e a sensibilidade barorreflexa. Pode-se observar que existe uma importante correlação entre essas duas variáveis ( $r = -0.8392$  e  $p < 0.0001$ ): quanto

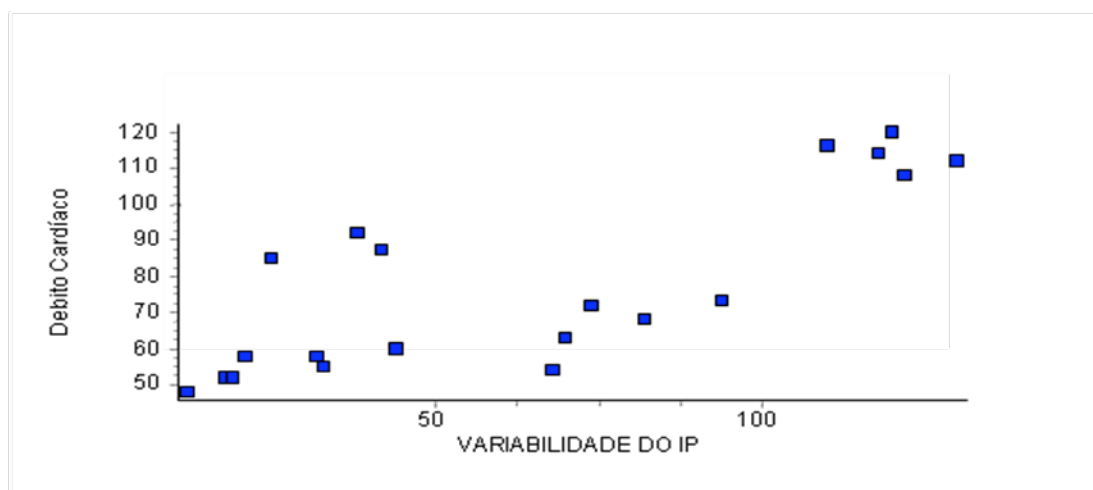
maior os níveis glicêmicos menor a sensibilidade do reflexo barorreceptor, analisada pela resposta de bradicardia, observada.



**Figura 18:** Correlação entre a sensibilidade barorreflexa (mmHg) e o nível glicêmico plasmático (mg/dL).

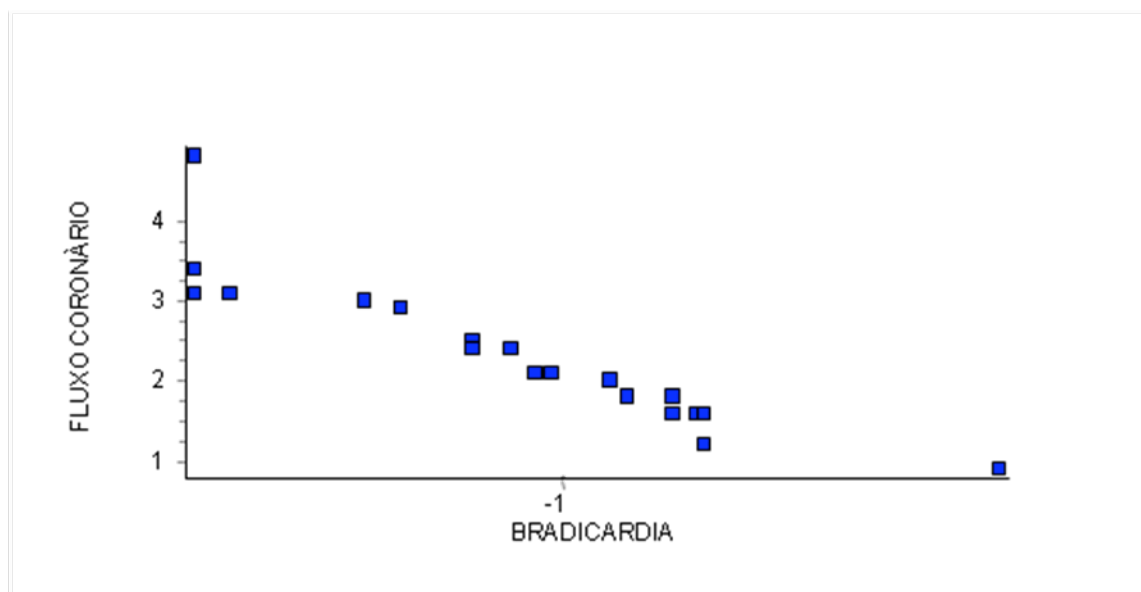
A figura abaixo mostra a correlação entre o débito cardíaco e a variabilidade do intervalo de pulso, pode-se observar que existe uma importante correlação entre essas duas variáveis ( $r = 0.7917$  e  $p < 0.0001$ ), quanto maior o débito cardíaco maior a variabilidade de pulso observada.





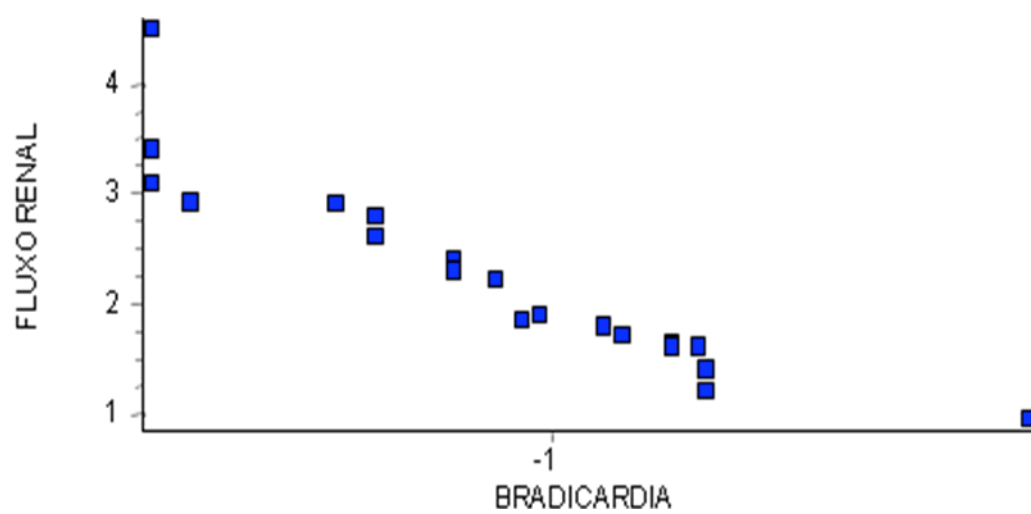
**Figura 19:** Correlação entre a variabilidade do intervalo de pulso (ms<sup>2</sup>) e o débito cardíaco (ml/ min).

A figura abaixo mostra a correlação entre o fluxo sanguíneo coronário e a resposta de bradicardia, pode-se observar que existe uma correlação entre essas duas variáveis ( $r = - 0,9201$  e  $p < 0,0001$ ), quanto melhor a resposta de bradicardia, isto é, a sensibilidade barorreflexa, maior o fluxo sanguíneo cardíaco observado.



**Figura 20:** Correlação entre a sensibilidade barorreflexa (mmHg) e o fluxo coronário (ml/min/g).

A figura abaixo mostra a correlação entre o fluxo sanguíneo renal e a resposta de bradicardia, pode-se observar que existe uma correlação entre essas duas variáveis ( $r = -0,9259$  e  $p < 0,0001$ ), quanto melhor a resposta de bradicardia maior o fluxo sanguíneo renal observado.



**Figura 21:** Correlação entre a sensibilidade barorreflexa (mmHg) e o fluxo renal (ml/min/g).

## **DISCUSSÃO**

---

## **5. Discussão**

### **5.1 Parâmetros Metabólicos**

#### **5.1.1 Peso corporal e Resposta à sobrecarga glicêmica**

A estreptozotocina foi descoberta e isolada primariamente pelos seus efeitos antibióticos e antineoplásicos. Posteriormente, veio a ser utilizada por muitos investigadores para induzir o diabetes mellitus em modelos experimentais, por conta de seus efeitos destrutivos nas células  $\beta$  pancreáticas (Bolzán et al., 2002). A ação diabetogênica da estreptozotocina mostra-se bastante eficiente na indução de um quadro severo de diabetes, apresentando alterações semelhantes às observadas em humanos diabéticos, como: hiperglicemia, hipoinsulinemia, poliúria e perda de peso (Junod et al., 1969).

O presente estudo confirma os resultados obtidos em trabalhos anteriores que demonstraram os prejuízos metabólicos induzidos pelo diabetes por STZ. Os grupos diabéticos apresentaram hiperglicemia e perda de peso corporal significativa (Maeda et al., 1995a; Dall'Ago et al., 1997; Schaan et al., 1997; De Angelis et al., 2000; Wichi et al., 2007; De Angelis et al., 2009), demonstrando um estado metabólico similar ao observado em humanos com diabetes descontrolado.

Ao contrário do observado nos grupos diabéticos, os animais normoglicêmicos (GC e GCD) aumentaram seus pesos corporais durante os 28 dias de protocolo. Todavia, os grupos submetidos à desnervação sino-

aórtica apresentaram redução do peso corporal, não sendo significativa quando comparado aos seus respectivos grupos controles; entretanto, isso nos leva a crer que estes animais têm uma tendência a um peso menor na avaliação final ( $p=0,075$ ). Vale ressaltar que a associação do diabetes e desnervação sino-aórtica não induziu redução adicional no peso corporal em relação ao grupo somente diabético.

Não existem estudos que tenham associado o diabetes com a DSA, tanto do ponto de vista metabólico como hemodinâmico. A perda do controle barorreflexo parece interferir na resposta à sobrecarga glicêmica, promovendo níveis menores não só na glicemia basal, mas também na área calculada sobre a curva, nos grupos submetidos à DSA. De fato, estudos demonstram que existe uma correlação entre a perda do barorreflexo e a alteração da modulação simpática e parassimpática para periferia (Irigoyen et al, 1995), incluindo o pâncreas (Chiasson et al., 2004). Além disso, a modulação simpática aumentada para a periferia, por ausência do controle tônico inibitório do barorreflexo, pode ter alterado as respostas metabólicas nesses grupos.

## **5.2 Avaliação da ingesta hídrica e da excreção urinária: gaiola metabólica**

A avaliação da função renal em gaiola metabólica mostrou aumento no consumo de água nos grupos submetidos ao diabetes e/ou DSA. Esse

aumento de consumo está associado ao aumento no volume urinário no grupo diabético, podendo indicar uma ação da hiperglicemia, levando à diurese osmótica e à ingestão de água compensatória, mostrando uma relação entre ingestão hídrica e perda urinária nesses animais. Por outro lado, os animais desnervados associados ou não ao diabetes, apresentaram um comportamento peculiar: aumento da ingestão hídrica. Entretanto, os animais GCD também apresentaram um aumento da perda urinária já o grupo GDD mesmo com o aumento de consumo, apresentou perda semelhante ao grupo diabético.

Os grupos diabéticos apresentaram um aumento na uréia excretada, o que provavelmente deve estar relacionado a um estágio inicial do desenvolvimento da insuficiência renal. Por outro lado, a presença de glicosúria encontrada nos grupos diabéticos era esperada devido ao estado hiperglicêmico desses animais.

Os animais diabéticos e/ou desnervados apresentaram proteinúria quando comparados aos animais controles, demonstrando mais uma vez a ocorrência de algum grau de comprometimento renal, conforme já descrito e esperado nesse modelo.

A excreção de sódio e potássio foi maior nos grupos GD, GCD e GDD. Os grupos diabéticos mostraram um aumento ainda maior na excreção de potássio, provavelmente associada a lesões musculares resultantes da hiperglicemia e do aumento da resistência vascular periférica e regional.

O aumento do volume urinário, bem como do sódio e potássio urinário nos animais desnervados talvez possa ser explicado também pela ação dos receptores cardiopulmonares. Sabe-se que na DSA existe um aumento da pressão diastólica final (PDF, dado não publicado), que poderia estar associado com aumento da estimulação dos receptores cardiopulmonares. De fato não só a possível distensão da cavidade cardíaca pelo aumento da PDF como o aumento da sensibilidade dos receptores cardiopulmonares induzidas pela desnervação sino-aórtica (Fernandes TL et al, 2010) levando à uma redução da atividade simpática renal, promovendo vasodilatação e conseqüentemente aumento de diurese e natriurese. Além disso, inibição da liberação de vasopressina por ação aumentada desses aferentes cardiopulmonares, em adição aos efeitos da desnervação sino-aórtica levariam também ao aumento da excreção de água (Alexander e Morris, 1988).

### **5.3 Avaliações morfométricas**

As imagens ultra-sonográficas das estruturas cardíacas e velocidade do fluxo sanguíneo pelo ecodopplercardiograma, são largamente reconhecidas por proporcionar algumas das mais acuradas medidas não invasivas para caracterização da massa ventricular e análise das funções sistólica e diastólica em humanos (Devereux et al., 1987; Devereux et al., 1986; Devereux & Reichek, 1977).

Em animais de experimentação, o uso do ecocardiograma como metodologia não invasiva da análise da função e estrutura cardíacas,



também vem se tornando rotina graças ao avanço tecnológico e desenvolvimento de transdutores ultra-sonográficos com frequências maiores, que proporcionam uma resolução adequada a pequenas estruturas (Pawlush et al. , 1993). Essa prática vem sendo amplamente utilizada em estudos que requeiram análise anátomo-funcional do sistema cardiovascular no curso temporal de determinada patologia, exatamente por permitir a sobrevivência do animal até o final do experimento. Moléstias como infarto do miocárdio, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, entre outras, com tratamento associado ou não, podem ser avaliados ao longo de períodos pré-estabelecidos através desta técnica.

No presente trabalho, aos 28 dias de DSA, os animais não mostraram alteração nas funções sistólica e diastólica do VE, quando comparados aos animais controle. Estas medidas, inclusive, encontram-se semelhantes às medidas descritas por Watson e cols. (2004), num estudo onde são propostos valores ecocardiográficos basais para ratos.

Por outro lado, o aumento súbito de PA pela interrupção das aferências carotídeas e aórticas, liberando o simpático de sua inibição tônica, poderia levar a alterações de estrutura cardíaca? Embora pudéssemos esperar este tipo de alterações, mesmo que transitórias (acompanhando o aumento da PA, por exemplo) pelo ecocardiograma não observamos alterações significativas do diâmetro de cavidade, da espessura do septo ou parede posterior do VE, avaliados durante a diástole.

Considerando ainda a variabilidade da PA, alta na DSA, sabe-se que está ligada à lesões de diferentes órgãos quando presente na hipertensão e

à predição de mortalidade após evento cardiovascular (La Rovere, 1998). De fato, a medida das massas do VE confirmou a presença de hipertrofia ventricular esquerda nestes animais, no presente estudo. Esses resultados corroboram dados obtidos por Miao e cols. (2003) que demonstraram hipertrofia moderada de VE e hipertrofia aórtica em ratos com DSA, bem como dados já publicados de nosso laboratório (Mostarda et al, 2010; Moraes-Silva et AL, 2010).

A hipertrofia de VD tem também sido relatada (Van Vliet, 1996) embora nem sempre encontrada (Miao e cols., 2003). Esses autores inclusive relatam que o aumento do VD encontrado por Van Vliet pode ser devido ao tipo de medida, pois o aumento do peso do VD está correlacionado à redução do peso corporal. Em dados obtidos em ratos WKY (Wistar Kyoto), Miao e cols., (2003) encontraram aumento de 22% no VD e redução de 6% no peso corporal (Miao e cols., 2003) após a DSA. Leve-se em conta, entretanto, que recentemente foi descrita hipertrofia cardíaca em ratos WKY normotensos (Aiello e cols., 2003) o quê realmente dificulta a conclusão. Dessa forma, a hipertrofia de VD permanece por ser mais bem estudada na DSA, inclusive porque há indicações de que dependa mais da desnervação dos quimiorreceptores com repercussões sobre a circulação pulmonar (Van Vliet, 1999).

Muitos investigadores têm demonstrado anormalidades na função sistólica e diastólica em humanos e em ratos diabéticos (Akula et al., 2003; Di Bonito et al., 1996, De Angelis et al., 2000; Wichi et al., 2007). O diabetes experimental por STZ tem sido associado com disfunção ventricular,

incluindo redução de contratilidade, diminuição da complacência ventricular e aumento da PDF (Fein et al., 1980; De Angelis et al., 2000; Dobrzynski et al., 2002; Akula et al., 2003). Esses estudos foram realizados *in vitro* em corações isolados, o que exigiu o sacrifício dos animais e a remoção dos reflexos autonômicos e do suprimento vascular. Akula et al. (2003) em um outro estudo concluíram que as disfunções sistólica e diastólica avaliadas pelo ecocardiograma são realmente evidentes após 12 semanas de diabetes. Esses autores afirmaram que a avaliação ecocardiográfica é um método eficaz no diagnóstico das anormalidades cardíacas do diabetes em ratos, não havendo, desta forma, a necessidade de avaliações histológicas, o que não é necessariamente, uma visão universal. De fato, em nosso laboratório, recentemente demonstramos que animais diabéticos por STZ apresentavam alterações estruturais, na função sistólica e diastólica em 30 dias após a indução, avaliados tanto pelo ecocardiograma quanto pela canulação do VE (Wichi et al., 2007). No presente estudo os animais diabéticos apresentaram redução da espessura diastólica do septo-interventricular (SIVDIA) e espessura diastólica da parede posterior (PPDIA).

O parâmetro de função diastólica (TRIV) se mostrou reduzido na avaliação ecocardiográfica do grupo desnervado diabético (GDD) em relação aos demais grupos. Além disso, é interessante chamar a atenção para o fato de que a presença de diabetes ou DSA isoladamente não induziu prejuízo da função diastólica destes animais. É possível que as diferenças desses achados com outros anteriores de nosso laboratório (Wichi et al, 2007)

sejam devidas ao tempo ou a gravidade do diabetes em que as medidas foram feitas.

A redução nos valores destes parâmetros sugere que o diabetes associado à desnervação sino-aórtica pode ter provocado deficiência no relaxamento ventricular dos animais estudados. O relaxamento cardíaco é um processo dinâmico que se inicia no final da contração e ocorre durante a fase de relaxamento isovolumétrico e início do enchimento ventricular.

#### **5.4 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas**

Utilizando medidas diretas da pressão arterial batimento-a-batimento, no presente estudo, as avaliações hemodinâmicas basais confirmaram a redução da PA e FC no grupo diabético e diabético/desnervado induzidos por estreptozotocina.

De fato, estudos do nosso laboratório, utilizando técnicas de medida direta (Maeda et al, 1995a; Dall 'Ago et al, 1997; Schaan et al, 1997; De Angelis et al, 2000; Morris et al, 2009), têm demonstrado repetidamente queda de PA basal em ratos diabéticos em diferentes tempos de diabetes experimental.

Entretanto, existem observações de aumento (Kawashima et al, 1978; Bunãg et al, 1982; Fein et al, 1991; Taked et al, 1991) ou não alteração da PA (Fiordaliso F, 2000) nestes animais. Na maioria dos trabalhos que demonstraram hipertensão basal, foram usadas técnicas

indiretas de medida de PA, através de pletismografia de cauda. Neste método, o aumento do tecido fibroso na cauda dificulta a oclusão da artéria caudal induzindo erros sistemáticos na medida da PA. É provável, portanto, que essa diferença nos níveis pressóricos basais deva-se aos diferentes métodos usados para a medida de PA (Carrier e Aronstan, 1987; De Angelis K et al., 2009).

Como explicar essa queda de PA observada nos animais diabéticos no presente experimento? Reconhecendo que a pressão arterial sistólica reflete a capacidade de trabalho cardíaco, como sugerido por Yu & McNeill (1992), poderíamos especular que o estado de hipotensão observado no presente trabalho possa estar relacionado à redução no desempenho ventricular. Reforçando essa possibilidade, encontramos na literatura estudos demonstrando que as mudanças observadas na pressão arterial de animais diabéticos poderiam estar relacionadas com alterações hemodinâmicas após o tratamento com estreptozotocina. É possível que alterações no débito cardíaco, produzidas pela queda da frequência cardíaca (efeito cronotrópico negativo), bem como pela redução da contratilidade ventricular (efeito inotrópico negativo) (De Angelis et al., 2000, 2009), pudessem contribuir para redução da pressão arterial em animais diabéticos, uma vez que, a pressão arterial relaciona-se diretamente com o débito cardíaco.

A redução de volume associada à hiperglicemia e diurese osmótica, conforme sugerido por Jackson & Carrier (1983) e Cohen et al. (1986) também poderia contribuir para redução da PA. É possível que uma

excessiva perda de volume pudesse explicar a redução do DC e conseqüentemente redução de fluxo sangüíneo em outros territórios em diabéticos (Brands & Fitzgerald, 1998). De fato, retornando ainda ao evento da hiperglicemia, lembramos que ela causa significativa natriurese e diurese, mesmo em animais com reduzida massa renal que não apresentam aumento da taxa de filtração glomerular. Dessa forma a perda de volume tem sido associada a redução da PA. Entretanto, mecanismos compensatórios, como ativação do sistema renina angiotensina renal, poderiam minimizar esses efeitos (Brands MW and Labazi H, 2008). Independente disso, a diurese osmótica poderia levar a um estado de retração do volume extracelular nesses indivíduos

No estado crônico, entretanto, a redução de volume deveria estar compensada pela redução do continente vascular conforme proposto por Guyton et al. (1981), através do mecanismo de auto-regulação total. Também o volume extracelular poderia estar sendo mantido por fluxos provenientes do compartimento intracelular (Cowley et al., 1996). De fato, Anwana & Garland (1991) mostraram que apesar de apresentarem desidratação intracelular, ratos diabéticos não apresentavam o volume extracelular diferente de ratos normais, o que indica um balanço entre perda urinária e retirada de volume das células para manutenção do volume naquele compartimento. Considerando essas informações, vale lembrar que o livre acesso à água, como realizado no presente estudo, foi importante na manutenção de volume em ratos diabéticos, o que parece ser confirmado

pelos valores de hematócrito que não mostraram diferença entre diabéticos e controles (Dall'Ago et al., 2002).

A bradicardia encontrada no diabetes por estreptozotocina em ratos é um achado freqüente e consistente na literatura (Bunag *et al.*, 1982; Kiff *et al.*, 1991a; Maeda *et al.*, 1995a; Maeda *et al.*, 1995b; Schaan *et al.*, 1997; Tomlinson *et al.*, 1990, Mostarda et al, 2009, Farah et al 2007, Souza SB et al, 2007). De fato, a bradicardia tem sido observada em tempos diferentes após a estreptozotocina como cinco dias, 14 dias, 30 dias (Dall'Ago *et al.*, 2002; Kiff *et al.*, 1991b; Maeda *et al.*, 1995b) e até 80 dias (De Angelis *et al.*, 2000; Dowell *et al.*, 1986; Pfaffman, 1980, Maeda et al, 2007). Ela pode ser parcialmente revertida através do controle metabólico obtido com a administração de insulina (Hicks *et al.*, 1998; Schaan *et al.*, 1997) e também com treinamento físico que esta associada à melhora na sensibilidade tecidual periférica a insulina (De Angelis *et al.*, 2000, Souza SB et al, 2007,).

Os mecanismos envolvidos na bradicardia de repouso do diabetes por STZ não estão completamente esclarecidos, mas possivelmente envolvem o tecido de condução cardíaco ou o sistema neuroendócrino (Hicks *et al.*, 1998). A possibilidade de o sistema nervoso autônomo (SNA) mediar a bradicardia, seja por aumento do tônus vagal ou diminuição do tônus simpático, foi examinada através de bloqueios farmacológicos utilizando atropina e propranolol (Hicks *et al.*, 1998; Maeda *et al.*, 1995). Os resultados mostraram que o tônus simpático e vagal para o coração estavam deprimidos e que a FC intrínseca (FCI) de marca passo (nodo sino-atrial) estava reduzida no diabetes. Estas evidências apontam para a importância

da FCI na determinação da bradicardia do diabetes experimental. Alterações de correntes iônicas poderiam reduzir a FCI através da diminuição da inclinação da onda de despolarização diastólica ou pela hiperpolarização do potencial diastólico máximo (Hicks *et al.*, 1998). A função dos canais iônicos pode ser influenciada por algumas alterações características do diabetes como alteração da composição dos lipídios de membrana, glicosilação e mudanças na expressão de proteínas (Hicks *et al.*, 1997). Também foi testada a resposta cronotrópica (bradicardia) à injeção de metacolina, um agonista colinérgico muscarínico, que demonstrou não estar alterada aos 5 dias após o STZ. Entretanto, o mesmo teste mostrou uma resposta bradicárdica aumentada 15 dias após a STZ no rato, sugerindo uma adaptação funcional (aumento de sensibilidade) dos receptores muscarínicos à diminuição do tônus vagal (De Angelis *et al.*, 2000). Vários estudos têm demonstrado diminuição do número de receptores beta adrenérgicos e muscarínicos cardíacos no diabetes, bem como alterações funcionais destes (Tomlinson *et al.*, 1992). É possível que o acoplamento do receptor muscarínico ao segundo mensageiro esteja alterado como demonstrado pelo aumento da quantidade de proteína Gi (inibitório) em tecido cardíaco após a administração de STZ (Nishio *et al.*, 1988). Estes trabalhos sugerem que as propriedades elétricas do coração e do sistema de condução cardíaco estejam envolvidas na geração da bradicardia do diabetes (Hicks *et al.*, 1998; Tomlinson *et al.*, 1992). Outra possibilidade é a participação dos diferentes sistemas hormonais controladores da PA estarem interferindo no controle da frequência cardíaca de animais



diabéticos (Maeda et al, 2007). Hipotireoidismo também tem sido atribuído como causa de bradicardia possivelmente mediando uma diminuição do número de receptores beta adrenérgicos no coração do diabetes por STZ (Dowell *et al.*, 1992; Tomlinson *et al.*, 1992, De Angelis K et al, 2009).

Como já bem estudado por nosso grupo e outros pesquisadores, a DSA no rato tem sido utilizada desde sua descrição (Krieger, 1964) como um modelo biológico para estudar o papel do barorreflexo em diferentes situações fisiológicas e patológicas (Osborn e England, 1990; Alexander e cols., 1990; Shade e cols., 1990)

Descrita originalmente como um modelo de hipertensão neurogênica (Krieger, 1964), é atualmente utilizada como um modelo de variabilidade de PA. De fato, com o aperfeiçoamento tecnológico dos sistemas de registro foi possível após longos períodos de observação, detectar que a hipertensão observada agudamente (24h) retorna a níveis de normalidade (Norman e cols. 1980; Norman e cols., 1981; Franchini e Krieger, 1992; Irigoyen, 1995), e que, no entanto, a variabilidade da PA se mantém (Irigoyen, 1995). A hipertensão é acompanhada de taquicardia (Vasquez E Krieger, 1982) e aumento da atividade simpática, que retornam a valores observados em animais intactos, na fase crônica da DSA como observado no presente estudo.

Mais recentemente a DSA tem sido utilizada como modelo de deficiência do barorreflexo ou de aumento da variabilidade da PA (Moraes-Silva et al, 2010, Mostarda et al, 2010, Piratello et al, *in press* Clinics), No presente trabalho confirmou-se que animais desnervados não apresentam

diferença dos controles na PA e FC. Entretanto os desnervados diabéticos (Grupo GDD) apresentam PAM menor que os somente diabéticos, provavelmente devido à redução da PAD, uma vez que a PAS não se encontrava reduzida em comparação ao grupo somente diabético. É possível que a redução da modulação simpática vascular nesse grupo tenha contribuído para essa redução.

### **5.5 Avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores**

Para manter a homeostase do meio interno a circulação sanguínea deve ser sempre adequada para suprir as necessidades individuais e momentâneas de cada tecido. Considerando-se que, em função da atividade do organismo, as necessidades das células e dos tecidos variam grandemente de um momento para outro, deve-se pressupor a existência de mecanismos de controle bastante eficazes. A regulação neuro-hormonal da PA comandada pelos barorreceptores arteriais é, sem dúvida, o mecanismo mais importante para corrigir de forma imediata os desvios para mais e para menos dos níveis basais da PA. Os pressorreceptores são um importante mecanismo de proteção contra oscilações da PA, agindo tanto no ramo simpático como no parassimpático do sistema nervoso autonômico (De Angelis *et al.*, 2002, Fernandes TL, 2010). Vários trabalhos têm avaliado a participação do controle reflexo da PA no diabetes sugerindo que o mesmo esteja alterado (Chang *et al.*, 1986; Dall'Ago *et al.*, 2002; Hicks *et al.*, 1998; Lund *et al.*, 1992; Maeda *et al.*, 1995a; Maeda *et al.*, 1995b; McDowell *et al.*,

1994a; McDowell *et al.*, 1994b; Van Buren *et al.*, 1998, Souza SB *et al.*, 2010, De Angelis K *et al.*, 2009).

A neuropatia autonômica é uma importante complicação do diabetes associada à alta morbidade e mortalidade justificadas por distúrbios de condução cardíacos, arritmias, hipotensão postural e morte súbita. Experimentos do nosso grupo têm demonstrado que o diabetes por STZ com duração mínima de cinco dias é associado à diminuição da resposta taquicárdica e manutenção da resposta bradicárdica (Maeda *et al.*, 1995a; Maeda *et al.*, 1995b), e que posteriormente (15 e 30 dias após a STZ) a resposta bradicárdica também é prejudicada (Dall'Ago *et al.*, 2002) persistindo até 80 dias após a STZ (De Angelis *et al.*, 2000). Outros autores descrevem manutenção da resposta taquicárdica (simpático) e diminuição da resposta bradicárdica (parassimpático) em coelhos tornados diabéticos por Aloxano, um modelo de diabetes experimental (McDowell *et al.*, 1994a). Em seqüência a estes achados, estes autores ainda estudaram a aferência, integração central e eferência deste reflexo, demonstrando que a inclinação da curva relacionando a pressão arterial com a atividade do nervo renal (eferência) não estava afetada assim como a resposta da FC à estimulação vagal e, portanto atribuíram a atenuação da resposta bradicárdica a um defeito seletivo central do ramo parassimpático (McDowell *et al.*, 1994b). Em contraste, outro estudo demonstrou aumento das respostas de FC à estimulação elétrica vagal para ratos diabéticos comparados a controles, apesar da redução da resposta bradicárdica observada, sugerindo que as fibras aferentes não são responsáveis pela atenuação da bradicardia

(Dall'Ago *et al.*, 2002, 2007) e que a eferência seja o local responsável pela disfunção observada neste modelo de diabetes.

No presente estudo, observamos que o controle reflexo da PA comandado pelos pressorreceptores está prejudicado no diabetes e abolido na presença da desnervação sino-aórtica, o que indica a efetividade da desnervação sino-aórtica realizada nesse estudo. Além disso, a associação de diabetes e desnervação induz um prejuízo maior no grupo GDD, possivelmente por serem o diabetes e a desnervação sino-aórtica, isoladamente, associados com redução da sensibilidade do reflexo comandado pelos barorreceptores.

Ao avaliarmos a importância da integridade do barorreflexo na evolução da cardiomiopatia e da nefropatia diabética, observamos que a sensibilidade barorreflexa correlaciona-se positivamente com os valores glicêmicos, isto é, quando maior a sensibilidade do barorreceptor, menor os valores glicêmicos observados. Foi possível demonstrar, que esse mecanismo de controle da PA, não apenas está envolvido com a regulação do sistema cardiovascular como também se associa à homeostase da glicose. Essa interrelação pode estar mecanisticamente ligada com as lesões de órgãos alvo, uma vez que as correlações encontradas mostram que o prejuízo do barorreflexo está relacionado com a redução dos fluxos sanguíneos cardíacos e renais observadas nesse trabalho.

## **5.6 Avaliação da função autonômica**

O estudo da variabilidade da pressão arterial e da frequência cardíaca no domínio do tempo e da frequência nos permite avaliar a modulação autonômica do sistema cardiovascular. De fato, já está bem estabelecido na literatura que em ratos, o componente oscilatório de baixa frequência para os vasos e coração reflete a modulação simpática enquanto que o componente de alta frequência representa a modulação parassimpática para o coração (Stolarz et al., 2004; Farah et al., 2004, 2007).

Uma complicação frequentemente associada ao diabetes mellitus é o desenvolvimento da neuropatia autonômica sendo associada a altas taxas de morbidade e mortalidade em pacientes sintomáticos (Ewing et al., 1980). Em indivíduos diabéticos, alterações da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), bem como das bandas de baixa (LF) e alta (HF) frequências, observadas pela análise espectral, podem preceder sintomas clínicos de disfunção autonômica (Task Force, 1996). Estudos de nosso grupo têm mostrado redução na sensibilidade barorreflexa, tônus cardíaco vagal e VFC em animais diabéticos por STZ (De Angelis, 2002; Schaan, 2004).

Em virtude da neuropatia autonômica, pacientes com diabetes mellitus normalmente apresentam uma reduzida habilidade de regular a frequência cardíaca, atribuída não só a redução na sensibilidade dos pressorreceptores, mas também pela presença de uma disfunção parassimpática cardíaca e/ou central. A injúria diabética ao sistema nervoso parassimpático pode reduzir a VFC, determinada principalmente pelos danos

causados ao controle parassimpático, tornando-se assim um importante índice de disautonomia nestes pacientes (Pagani et al, 1988, Dallago et al, 2007). Na literatura parece haver um consenso no que diz respeito à redução da VFC no diabetes, demonstrada tanto em humanos (Gottsäter e cols, 2006), ratos e outros modelos animais de diabetes (Mésangeau e cols, 2000). Em nosso estudo foi possível observar alteração da VFC nos grupos diabéticos. A redução da VFC nos pacientes e animais diabéticos (Farah et AL, 2007) está principalmente relacionada à redução dos dois componentes oscilatórios LF e HF, mesmo na ausência de outras manifestações nos parâmetros cardiovasculares (Mésangeau e cols, 2000). Além disso, a redução da banda de LF tem sido correlacionada à progressão de aterosclerose em indivíduos diabéticos tipo II, avaliada pela espessura íntima/média da carótida (Gottsater et al., 2006).

Estudos demonstram a redução dos IP e conseqüente aumento da FC nos animais DSA agudamente e o retorno a valores próximos aos de ratos controle após 21 dias de desnervação o que pode ser atribuído, pelo menos em parte, à atividade simpática aumentada que é observada na fase aguda mas não na crônica (Barres *et al.*, 1992; Irigoyen *et al.*, 1995, Mostarda et al, 2010). De fato, está bem estabelecido que a desnervação sino-aórtica produz taquicardia (Vasquez, 1980) que é progressivamente maior, atingindo valores máximos após cinco horas. A partir deste ponto, a FC passa então a cair até atingir valores normais o que acontece em aproximadamente 10 dias. Essa queda é acompanhada de redução do tônus simpático bem como de redução da freqüência cardíaca intrínseca (Vasquez, 1980). Nesta fase

ocorre aumento médio da atividade simpática e redução de sua variabilidade (Barres *et al.*, 1992), sugerindo uma possível saturação do sistema, o que pode explicar o comportamento do IP nos ratos agudamente submetidos a DSA. No presente trabalho observamos uma redução progressiva da variabilidade do IP quando observamos os grupos experimentais na sequência GD, GCD e GDD e comparamos ao GC. Essa redução era esperada tanto nos grupos diabéticos como nos desnervados. Chama a atenção entretanto, a redução maior observada no grupo GDD. É possível que os mecanismos envolvidos na redução da variabilidade e que envolvem a disfunção autonômica do diabetes e a retirada do freio inibitório exercido pelos barorreceptores na DSA tenham tido um efeito somatório na indução da redução do IP nesse grupo (GDD).

Ainda no domínio do tempo, a PAS e a PAD apresentaram comportamentos semelhantes entre si nas duas fases da DSA, caracterizadas por um aumento dos valores médios na fase aguda, redução na fase crônica e manutenção de uma labilidade aumentada nestas duas fases. Esta combinação de efeitos sugere que os valores médios das pressões sistólica e diastólica dependem em grande parte do aumento da atividade simpática quantificada diretamente pela medida da atividade do nervo simpático renal (Barres *et al.*, 1992; Irigoyen *et al.*, 1995). A importância da hiperatividade simpática no aumento da resistência periférica total dos ratos desnervados tem sido também confirmada pela reversão das hipertensão após bloqueio autonômico adrenérgico (Werber *et al.*, 1984).

A manutenção da labilidade aumentada tanto na fase aguda quanto crônica, sugere que esta seja determinada mais pela destruição dos barorreceptores (Barres *et al.*, 1992), do que pela variação da atividade do sistema nervoso autônomo, uma vez que a hiperatividade simpática demonstrada na fase aguda não se observa cronicamente (Alexander *et al.*, 1980; Alper *et al.*, 1987). Consistente com essa idéia, Barres *et al.* (1992) e Irigoyen *et al.* (1995) mostraram que a atividade simpática renal na fase crônica da DSA está normal.

### **5.7 Domínio da frequência**

No domínio da frequência, a variância dos IP correspondeu a uma redução da variabilidade total na fase crônica da DSA assim como nos grupos diabéticos, desnervados ou não.

Para potência normalizada ou para o balanço autonômico (LF/HF) as diferenças foram evidentes apenas nos grupos diabéticos com relação aos demais grupos. Como esperado existe uma redução da variabilidade da FC nos animais diabéticos embora não se tenha encontrado grande diferença nas proporções de LF e HF. Entretanto, as diferenças foram capazes de mostrar uma redução do balanço, que na verdade pode ser atribuído a uma redução total da VFC. Com relação aos grupo só desnervado, a redução do componente LF tem sido associada a aumento da ativação simpática nesse grupo. No grupo GDD esta modulação ainda foi mais reduzida. De forma



geral a variância total cai progressivamente em todos os grupos (GD, GCD, GDD) em relação ao controle.

Influências fisiológicas ou farmacológicas podem provocar modificações na modulação entre simpático e parassimpático, como no caso do exercício físico, onde se observa uma alteração no balanço autonômico em favor do componente de LF (Ahmed *et al.*, 1994). Na DSA não se observou alteração no balanço autonômico com aumento do índice LF/HF, apesar das evidências em favor de uma hiperatividade simpática na desnervação. Este fato conduz a duas hipóteses explicativas: 1) o balanço autonômico foi mantido após a DSA, ou ainda 2) mesmo que a atividade simpática pudesse estar aumentada para alguns territórios e isso pudesse ter conduzido o sistema a um estado de saturação, a análise espectral é uma ferramenta que discrimina modulação autonômica e não tônus autonômico (Malik e Camm, 1993), o que justificaria a falta de alterações no padrão dos componentes de frequência do espectro. Considerando os resultados obtidos por Vasquez e Krieger (1982), pelo menos na fase crônica nós teríamos elementos para confirmar a primeira hipótese, uma vez que, tanto o tônus vagal como o simpático para o coração estavam diminuídos quando analisados pelo bloqueio farmacológico (Soares *et al.*, 2005) Ou seja, não teria havido alteração de balanço autonômico. Quanto a segunda hipótese, é fato já evidenciado o grande aumento da atividade simpática na fase aguda da desnervação o que não tem sido confirmado na fase crônica. Dados recentes de nosso laboratório, inclusive apresentados nesse estudo apontam para um aumento da resistência

periférica total na DSA, o que poderia ser associado com aumento da atividade simpática.

### **5.8 Avaliação do Fluxo Sanguíneo Regional**

A manutenção do fluxo sanguíneo é importante para a sustentação da homeostase no organismo. Diversos trabalhos já demonstraram a importância do fluxo regional na progressão de doenças, como: Isquemias cardíacas e cerebrais, hipertensão e no DM (Gerritsen J, 2001). Resultados não publicados de nosso laboratório mostraram redução do fluxo coronário avaliado aos 15 e aos 90 dias pós indução do diabetes por estreptozotocina. De fato os animais diabéticos estudados apresentaram comportamento semelhante com redução do fluxo sanguíneo em todos os territórios analisados; isso se deve provavelmente, ao aumento da resistência vascular periférica e à redução do débito cardíaco observados nesse trabalho

Já essa redução do DC pode estar ligada à redução da FC, classicamente já demonstrada nesse modelo experimental (Hicks et al 1998). O que nos leva a associar essa redução a uma lesão no marca passo cardíaco desses animais, previamente já discutido (Maeda et al, 1995, 2007).

Outro dado observado nesse trabalho é que a redução do fluxo sanguíneo nesse modelo experimental é acompanhada de aumento da RVP e de redução do DC. Isso faz com que a PA embora com valores dentro dos

limites da normalidade, permaneça reduzida quando comparada ao controle intacto. É provável que este aumento da RVP dependa do tônus miogênico aumentado bem como da disfunção endotelial já descrita nesse modelo. (Brands et al; 2000) Conforme já demonstrado, indivíduos com DM tipo 2 apresentam uma menor complacência vascular devido a uma aumento de potencial para desenvolver a lesão aterosclerótica.

Quando analisamos o efeito da desnervação sino-aórtica no fluxo sanguíneo, notamos uma redução do mesmo em todos os territórios estudados. Isso provavelmente reflete um aumento da RVP que se sabe deve estar acompanhada de redução do DC. Essa redução é menor do que a observada em diabéticos e isso provavelmente está associado à manutenção da FC basal, ao contrário do observado no grupo diabético. Quanto ao débito cardíaco, as evidências indicam redução possivelmente devido a diminuição do volume sistólico (Krieger, 1979) frente ao grande aumento da pós-carga (por aumento de resistência periférica total).

Quando comparamos a redução dos fluxos regionais com o aumento calculado da RVP, nos diferentes modelos, percebemos que percentualmente a redução nos fluxos foi maior que o aumento da RVP. Isso sugere que possa existir até aumento de fluxo em algum território não avaliado o que justificaria o aumento percentual menor da RVP.

A resistência periférica total esteve maior em todos os grupos desnervados estudados quando comparada aos animais controle. Como

resposta adaptativa a MVE aumentou. De fato, a hipertrofia cardíaca pode estar associada ao aumento da pós carga, que, quando somada ao efeito da pré carga também aumentada, contribuiu para a alteração estrutural cardíaca observada. Além disso, a redução de fluxos sanguíneos para os território estudados (pois na verdade não estudamos todos os leitos vasculares) sugere que assim como no coração essa redução possa ter contribuído para outras respostas de ajuste, como ativação do sistema renina angiotensina renal e de alguma forma associada a lesão do órgão afetado.

Muitos estudos têm demonstrado diminuição da complacência vascular no diabetes (Salomaa V, 1995; Rafidah 2010) que associada a redução do DC e da FC poderiam explicar a redução dos fluxos sanguíneos observada nesses animais.

### **5.9 Avaliação da Função Renal ex vivo: perfusão renal**

No presente estudo, foi utilizado o sistema de perfusão renal fechado baseado nos estudos desenvolvidos por Bowman and Maack (1974); Ross (1978); Pegg (1971); Hamilton et al. (1974) e modificado por Fonteles et al (1983); Lima et al (1992).

A pressão de perfusão (PP) flutuou significativamente no GD enquanto que no grupo controle flutuou dentro dos limites de normalidade, portanto, se mantendo estável durante os 120 minutos de protocolo.

Além disso, a alteração da PP nos animais diabéticos foi acompanhada de um aumento importante na resistência vascular renal (RVR), sugerindo a liberação de fatores ativos intrarenais, além de fatores de adaptação miogênicos. Vale ressaltar que os rins provenientes dos animais do GD, estavam em um ambiente hiperglicêmico e hiperfiltrante, diferente do meio em que foi realizada a perfusão renal.

O ritmo de filtração glomerular (RFG), que reflete a quantidade de filtrado formado a cada minuto através do movimento do sangue pelos glomérulos, aumentou significativamente no grupo GD.

Essas alterações refletiram no fluxo urinário (FU) que aumentou no grupo diabético, alcançando os maiores valores aos 120 minutos.

Podemos inferir que essas alterações condizem com a capacidade do rim diabético em se adaptar a nova situação imposta pela perfusão renal ex-vivo, alterando seu funcionamento para ajustar-se a uma situação de normalidade de pressão, variabilidade da pressão e normoglicemia

Já os animais desnervados mantiveram a PP estável durante o protocolo experimental. A RVR também não mostrou variação ao longo do tempo, embora o GDD mostrasse uma tendência a aumentar essa resistência em todos os tempos avaliados. Como o ritmo de filtração glomerular também não se alterou nesses animais, não houve repercussão no fluxo urinário desses grupos.

Diferentemente do observado no GD, os rins provenientes dos animais desnervados não conseguiram adaptar-se, mantendo as características de funcionamento observadas em vivo. Os resultados

apresentados nesse trabalho não são conclusivos, embora possam indicar que alterações da função barorreflexa possa interferir na resposta do rim isolado em indivíduos diabéticos. Outros estudos deverão ser conduzidos para que se possa melhor avaliar os efeitos da modulação autonômica periférica comandada pelos barorreceptores sobre alterações da função renal em diabéticos.

---

## SUMÁRIO E CONCLUSÕES

---

## 6. Sumário e Conclusões

Os dados obtidos neste trabalho demonstram:

- O diabetes induz redução de peso corporal, aumento da glicemia plasmática e da intolerância a glicose, além de reduzir a PAM, a FC, a sensibilidade barorreflexa, associadas a prejuízo no controle autonômico. Observou-se também alterações no débito cardíaco, no volume sistólico, fluxo sanguíneo regional e na RVP. Na função renal in vivo observou-se a presença de alterações sugestivas de lesão e prejuízo da sua função. Já na função renal ex vivo, pode-se observar uma adaptação do rim ao meio normoglicêmico, evidenciado pelo aumento do ritmo de filtração glomerular e do fluxo urinário.
- A desnervação sino-aórtica não influenciou o ganho de peso, mas reduziu a glicemia e melhorou a resposta a sobrecarga glicêmica. Não foram observadas alterações hemodinâmicas, porém observou-se aumento da MVE, redução da sensibilidade barorreflexa acompanhada de prejuízo na função autonômica.. O fluxo regional esteve diminuído em todos os territórios avaliados, acompanhado por aumento da RVP e redução do débito cardíaco, entretanto não foi observada redução do volume sistólico desses animais. Na função renal observamos aumento do volume urinário e da excreção de sódio durante as avaliações em gaiola metabólica enquanto no sistema de



perfusão ex vivo o rim desses animais não conseguiu compensar os danos causados pela DAS.

- No grupo resultante da associação de diabetes e DSA podemos ressaltar os resultados hemodinâmicos, onde foi observada queda no valor da PAM, FC e ausência do barorreflexo. Adicionalmente, essa associação levou a uma redução maior na variabilidade do IP do que aquela observada nessas situações isoladamente. Esses animais também apresentaram aumento da resistência periférica total e regional juntamente com a redução de todos os fluxos regionais. A função renal mostrou-se semelhante a observada no grupo desnervado, o diabetes não modificou a resposta diante da DSA.

Esses resultados obtidos no presente trabalho nos permitem concluir que o papel homeostático do barorreflexo é essencial no curso das alterações cardíacas e renais tanto em animais normoglicêmicos como nos hiperglicêmicos, por sua ação não só no controle das variações momento a momento (labilidade) como também nas alterações da PA bem como por seu papel (aqui descrito pela primeira vez) na homeostase da glicose.. Esses resultados poderão dar suporte a estudos de intervenção que possam melhorar a sensibilidade do barorreflexo e dessa forma contribuir para um melhor controle na evolução da doença cardiovascular no diabetes. Adicionalmente, outros estudos sobre a influencia da função barorreceptora na evolução da doença renal serão necessários, uma vez que nossos resultados foram modestos mecanisticamente na interpretação das alterações observadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

## 7. Referências bibliográficas

1. **Allen TJ, Waldron MJ, Casley D, Jerums G, Cooper ME.** Salt restriction reduces hyperfiltration, renal enlargement, and albuminuria in experimental diabetes. *Diabetes*. 1997; 46, 19-24.
2. **Bank N. & Aynedjian HS.** Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration. *Kidney Int.* 1993; 43: 1306-1312.
3. **Barres, C; Lewis, SJ; Jacob, HJ; Brody, MJ.** Arterial pressure lability and renal sympathetic nerve activity are dissociated in SAD rats. *Am J Physiol.* v.263, p. R639-46, 1992.
4. **Bolzan AD, Bianchi MS.** Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res.* 2002; 512 (2-3):121-34.
5. **Borges GR, de Oliveira M, Salgado HC, Fazan R Jr.** Myocardial performance in conscious streptozotocin diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2006; 4;5:26.
6. **Bowman RH. & Maack T.** Effect of albumin concentration and ADH on H<sub>2</sub>O and electrolyte in perfused rat kidney. *Am J Physiol.* 1974; 226(2): 426-430.
7. **Brandenburg SL, Reusch JE, Bauer TA, Jeffers BW, Hiatt WR, Regensteiner JG.** Effects of exercise training on oxygen uptake kinetic responses in women with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 1999; 22(10):1640-6.

8. **Bruno, R. & Gross, J.L.:** “Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3,6 year followup study”. *J Diabetes Complications*, Nova Iorque, v.14,n.5, p.266-71; 2000.
9. **Cameron NE, Cotter MA.** The relationship of vascular changes to metabolic factors in diabetes mellitus and their role in the development of peripheral complications. *Diabetes Metab Rev.* 1994; 10(3):189-224.
10. **Chen Y, Joaquim LF, Farah VM, Wichi RB, Fazan R, Jr. Salgado HC, Morris M.** Cardiovascular Autonomic Control in Mice Lacking Angiotensin AT1a Receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288:R1071-R1077.
11. **Chiasson J-L, Josse RG, Hunt JA, et al.** The efficacy of acarbose in the treatment of patients with noninsulin dependent diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1994;121: 928-35.
12. **Da Silva ICM, RN De La Fuente, C Mostarda, K Rosa, K Flues, NR Damaceno-Rodrigues,EG Caldini, K De Angelis, EM Krieger and MC Irigoyen.** *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (2010) 37, e114–e120, 2010.
13. **D'Agord Schaan B, Lacchini S, Bertoluci MC, Irigoyen MC, Machado UF, Schmid H.** Increased renal GLUT1 abundance and urinary TGF-beta 1 in streptozotocin-induced diabetic rats: implications for the development of nephropathy complicating diabetes. *Horm Metab Res.* 2001; 33(11): 664-669.

14. **Dall'ago P., Fernandes T.G., Machado U.F., Bello A.A., Irigoyen M.C.**  
Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats.  
*Braz. J. Med. Biol. Res.*(1997)30:119-24.
15. **De Angelis, K., Schaan, B.D., Maeda, C.Y. & Dall'ago, P., Wichi, R.B. & Irigoyen, M.C.** Cardiovascular control in experimental diabetes. *Braz J Med Biol Res*, v. 35, n. 9, p. 1091-1100, Sep. 2002.
16. **De Angelis K.L., Oliveira A.R., Dall'ago P., Peixoto L.R., Gadonski G., Lachinni S., Fernandes T.G., Irigoyen M.C.** Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. .  
*Braz. J. Med. Biol. Res.* (2000) 33: 635-41.
17. **De Angelis K, Irigoyen MC, Morris M.** Diabetes and cardiovascular autonomic dysfunction: application of animal models. *Auton Neurosci.* 2009; Jan 28;145(1-2):3-10.
18. **DeQuattro V, Feng M.** The sympathetic nervous system: the muse of primary hypertension. *Journal of Human Hypertension.* 2002; 16:s64-69.
19. **Dias DS, Gnecci-Ruscione T, Lavelli B, Bellina V, Manzella D, Porta A, Malliani A, Montano N.** Opposite Effects of Iv Amiodarone on Cardiovascular Vagal and Sympathetic Efferent Activities in Rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283:R543-R548.
20. **Dobrzynski E, Montanari D, Agata J, Zhu j, Chao J, Chao L.** Adrenomedullin improves cardiac function and prevents renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol Endocrin Metab.* 2002; 283(6): E1291-8.

21. **Duncan, B.B., Schmidt, M.I., Giugliani, E.R.J.** Medicina Ambulatorial: Conduas Clínicas em Atenção Primária, 2. Ed., Artes Médicas, Porto Alegre, 1996
22. **Ewing DJ, Campbell IW, Clarke BF.** The natural history of diabetic autonomic neuropathy. *Q J Med.* 1980; 49: 95-108.
23. **Farah VM, Joaquim, LF, Bernatova, I, Morris, M.** Acute and Chronic Stress Influence Blood Pressure Variability in Mice. *Physiol Behav* 2004; 83:135-142.
24. **Fard A, Wang CY, Takuma S, Skopicki HA, Pinsky DJ, Di Tullio MR, Homma S.** Noninvasive assessment and necropsy validation of changes in left ventricular mass in ascending aortic banded mice. *J Am Soc Echocardiogr.* 2000 Jun; 13(6): 582-7.
25. **Fazan R Jr, Ballejo G, Salgado MC, Moraes MF, Salgado HC.** Heart rate variability and baroreceptor function in chronic diabetic rats. *Hypertension.* 1997; 30(3 Pt 2):632-5.
26. **Fernandes T.L., A.C. Piratello, V. Farah, P. Fiorino, E.D. Moreira; E.M. Krieger, M.C. Irigoyen.** The effect of carotid and aortic baroreceptors on cardiopulmonary reflex: the role of autonomic function, 2010.
27. **Floras JS, Hassan MO, Jones JV, Osikowska BA, Sever PS, Sleight P.** Consequences of impaired arterial baroreflexes in essential hypertension: effects on pressor responses, plasma noradrenaline and blood pressure variability. *Journal of Hypertension.* 1988; 6:525-535.

28. **Fonteles, M.C; Cohen,J.J; Black,A.J; Wertheim,S.J.** "Support Of Kidney Function By Long-Chain Fatty Acids Derived From Renal Tissue". *Am.J.Physiol.* 244:F235-F246; 1983
29. **Fonteles MC, Monteiro HAS, Soares AM, Santos-Neto MS, Greenberg RN, Lima AAM.** The lysine-1 analog of guanylin induces intestinal secretion and natriuresis in the isolated perfused kidney. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1996; 29:267-271.
30. **Fonteles MC, Greenberg RN, Monteiro HS, Currie MG, Forte LR.** Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol.* 1998; 275(2 Pt 2): F191-197.
31. **Fonteles MC, Carrithers SL, Monteiro HSA, Carvalho HF, Coelho GR, Greenberg RN.** Renal effects of serine-7 analog of lymphoguanylin in ex vivo rat kidney. *Am J Physiol.* 2001; 280: F207-213.
32. **Friberg, P; Hallback-Nordlander, M; Karlsson, B; Ljung, B.** Circadian rhythm of arterial blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive control rats. In: Rascher W, Clugh D, Ganted D (eds). *Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium on Rats with Spontaneous hypertension and Related Studies, heidelberg, Schattauer, Stuttgart, p. 361-3,1982.*
33. **Gagliardino JEA.** Um modelo de programa educacional para pessoas diabeticas tipo2. In: (Ed.). *Diabetes Care: Alexandria, 2002.* Um modelo de programa educacional para pessoas diabeticas tipo2., p.12
34. **Gerritsen J, Dekker JM, Ten Voorde BJ, Kostense PJ, Heine RJ, Bouter LM, Heethaar RM, Stehouwer CD.** Impaired autonomic function

- is associated with increased mortality, especially in subjects with diabetes, hypertension, or a history of cardiovascular disease: the Hoorn study. *Diabetes Care*. 2001. 24(10):1793-8.
35. **Gotzsche**. Myocardial cell dysfunction in diabetes mellitus: a review of clinical and experimental studies. *Diabetes*, 35: 1158-1162, 1986.
36. **Guyton, A. C.** Fisiologia Humana. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 1981.
37. **Hamilton RL, Benny NM, Williams MC, Severinghaus EMA.** Simple and inexpressive membrane "lung" for animal organ perfusion. *J Lipid Res*. 1974, 9; 667-668.
38. **Ilstrup K.M. , Keane W.F. , Michels L.D.** Intravascular and extracellular volumes in the diabetic rat. *Life Sci.* ( 1981 ) 29:717-724.
39. **Irigoyen MC, Consolim-Colombo FM, Krieger EM.** Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. *Revista Brasileira de Hipertensão* 2001; 8:55-62.
40. **Irigoyen MC, Krieger EM.** Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1998; 31:1213-1220.
41. **Irigoyen, M.C.; Moreira, E.D.; Ida, F.; Pires, M.; Cestari, I.A.; Krieger, E.M.** Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rats. *Hypertension*, v.6,n.2 ,p.1111-6, 1995.



42. **Irigoyen, M.C.; Cestari, I.A.; Moreira, E.D.; Oshiro, M.S.; Krieger, E.M.** Measurements of renal sympathetic nerve activity in conscious sinoaortic denervated rats. *J Med Biol Res*, v. 21 , n. 4, p. 869-72,1988.
43. **Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, et al.** Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001; **24**: 683–89.
44. **Joaquim LF, Farah VM, Bernatova I, Fazan R, Jr. Grubbs R, Morris M.** Enhanced Heart Rate Variability and Baroreflex Index After Stress and Cholinesterase Inhibition in Mice. *Am J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004; 287:H251-H257.
45. **Junod A., Lambert A.E., Stauffacher W., Renold A.E.** Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest.* (1969) 48(11):2129-39.
46. **Kannel WB; McGee DI.** Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA.* 1979 May 11;241(19):2035-8.
47. **Kaplan NM.** Primary Hypertension: Pathogenesis. In: *Clinical Hypertension*, Kaplan NM. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998; 41-99.
48. **King H, Aubert RE, Herman WH.** Global burden of diabetes, 1995-2025. Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care.* 1998; 21:1414-1431.
49. **Krieger, E.M.** Neurogenic Hypertension in the rat, capítulo 19. In: *Handbook of Hypertension, Vol. 4: Experimental and Genetic models of Hypertension*, W de Jong Ed. Elsevier Science, 1984.

50. **Krieger, E.M.** Neurogenic Hypertension in the rat. *Circ Res.* v.15, p. 511-21, 1964.
51. **Krieger, E.M.** The acute phase of neurogenic hypertension in the rat. *Experientia.* v.26, n.6, p.628-9, 1970.
52. **Krieger, E.M; Michelini, L.C.** Dados básicos sobre a manutenção da pressão arterial. *Rev. Cardiol. Estado de São Paulo.* V2, n. 4, p.9-17, 1992.
53. **Komers R, Allen TJ & Cooper ME.** Role of endothelium-derived nitric oxide in the pathogenesis of the renal hemodynamic changes of experimental diabetes. *Diabetes* 1994; 43 1190-7.
54. **Komers R. & Cooper ME.** Renal sodium handling in experimental diabetes: role of NO. *Nephrol Dial Transplant.* 1996; 11: 2170-2177.
55. **La Rovere, MT., Bigger JR, JT., Marcus FI., Mortara A., Schwartz, PJ.,** Baroreflex Sensitivity and Heart-Rate Variability in Prediction of Total Cardiac Mortality After Myocardial Infarction, *The Lancet*, v. 351, 1998, 478-484.
56. **La Rovere MT, Bersano C, Gnemmi M, Specchia G, Schwartz PJ.** Exercise-induced increase in baroreflex sensitivity predicts improved prognosis after myocardial infarction. *Circulation.* 2002 Aug 20; 106(8): 945-9.
57. **Lagranha, C. J. ; Fiorino, P.; Casarini, D. E.; Schaan, B. D'A.; Irigoyen M. C.:** "Molecular Bases Of Diabetic Nephropathy". *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 51, p. 901-912; 2007.

58. **Lennane RJ, Peart WS, Carey RM, Shaw J.** A comparison of natriuresis after oral and intravenous sodium loading in sodium-depleted rabbits: evidence for a gastrointestinal or portal monitor of sodium intake. *Clin. Sci. Mol. Med.* 1975; 49:433-436.
59. **Lima AA, Monteiro HS, Fonteles MC.** The effects of Escherichia coli heat-stable enterotoxin in renal sodium tubular transport. *Pharmacol Toxicol.* 1992; 70(3):163-7.
60. **Loimaala A, Huikuri Hv, Koobi T, Rinne M, Nenonen A, Vuori I.** Exercise training improves baroreflex sensitivity in type 2 diabetes. *Diabetess.* 2003 Jul;52(7):1837-42.
61. **Maeda C.Y., Fernandes T.G. , Luthier F. , Irigoyen M.C.** Streptozotocin diabetes changes arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* (1995 a) 28: 497-501.
62. **Maeda C.Y., Fernandes T.G, Timm H.B.,Irigoyen M.C.** Autonomic dysfunction in short-term experimental diabetes. *Hipertension* (1995 b) 26: 1100-4.
63. **Malerbi DA; Franco LJ.** 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. *Diabetess Care.* 1992 Nov;15(11):1509-16.
64. **Malfitano C, Wich RB, Rosa K , De Souza SB; Salemi V, Moreira ED, Mostarda C, De Angelis K, Irigoyen MC.** *Braz J Med Biol Res*, 2004,

submetido noninvasive and invasive evidences of cardiac dysfunction in streptozotocin-diabetic rat: volume overload responses.

65. **Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S.** Cardiovascular Neural Regulation Explored in the Frequency Domain. *Circulation*. 1991; 84: 482-492.
66. **Mancia, G; Ferrari, A; Gregorini, L; Parati, G; Pomidossi, G; Bertinieri, G; Grassi, G; Di Rienzo, M; Pedotti, A; Zanchetti, A.** Blood pressure and heart rate variabilities in normotensive and hypertensive human beings. *Circ Res*. v.53(1) p.96-104, 1983.
67. **Martinez-Maldonado M & Opava-Stitzer S.** Free water clearance curves during saline, mannitol, glucose and urea. *J Physiol*. 1978, 280: 487-497.
68. **Michellini L.** Regulação neuro-humoral da pressão arterial. In: *Fisiologia*, Ayres MM, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. pp. 473-488.
69. **Muir A, Schatz DA, Maclaren NK.** The pathogenesis, prediction, and prevention of insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1992 Jun; 21(2): 199-219.
70. **Neumann C, Martinez D, Schmid H.** Nocturnal oxygen desaturation in diabetic patients with severe autonomic neuropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 1995; 28: 97-102.
71. **Oliveira VL, Irigoyen MC, Moreira ED, Strunz C, Krieger EM.** Renal denervation normalizes pressure and baroreceptor reflex in high renin hypertension in conscious rats. *Hypertension*. 1992 Feb;19(2 Suppl):II17-21.

72. **Oliveira V.L.L., Moreira E.D., Farah V.M.A., Consolim-Colombo F., Schaan B, Maeda C.Y., Timm H.B., Medeiros S, Moraes R.S, Ferlin E. , Fernandes T.G. , Ribeiro J.P. , Schimid H. , Irigoyen M.C.** Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in rats with streptozotocin-induced diabetes treated with insulin. *Braz. J. Med. Biol.Res.*(1997 ) 30: 1081-1086.
73. **Page MM, Watkins PJ.** Cardiorespiratory arrest and diabetic autonomic neuropathy. *Lancet.* 1978; 1: 14-16.
74. **Pegg ED.** Vascular resistance of the isolated rabbit kidney. *Cryobiology* 1971, 8: 431-440.
75. **Pickup JC, Willians G.** Chronic complications of diabetes. Blackwell Science. 1994; 41: 1151-1160.
76. **Pitts RF.** Physiology of the kidney and body fluids. Year Book Medical Publishers Inc., Chicago 2<sup>nd</sup>. Edition, 1971.
77. **Poornima IG, Parikh P, Shannon RP.** Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circ Res.* 2006; 98: 596-605.
78. **Qu P, Hamada M, Ikeda S, Hiasa G, Shigematsu Y, Hiwada K.** Time-course changes in left ventricular geometry and function during the development of hypertension in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension Research.* 2000; 23:613-623.
79. **Rerup CC.** Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev.* 1970 Dec; 22(4): 485-518.

80. **Ritz E, Rychlik I, Locatelli F, Halimi S.** End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis.* 1999; 34(5):795-808.
81. **Ross BD.** The isolated perfused rat kidney. *Clin Sci Mol Med.* 1978; 55: 13-21.
82. **Schaan BD, Maeda CY, Timm HB, Medeiros S, Moraes RS, Ferlin E, Fernandes TG, Ribeiro JP, Schmid H, Irigoyen MC.** Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in streptozotocin-induced diabetic rats treated with insulin. *Braz J Med Biol Res.* 1997 Sep; 30(9): 1081-6.
83. **Schaan BD, Dall'Ago P, Maeda CY, Ferlin E, Fernandes TG, Schmid H, Irigoyen MC.** Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37(12):1895-902.
84. **Schaan B., Bertoluci M.C., Lacchini S., Machado U.F., Irigoyen M.C., Schmid H.** Increased renal GLUT 1 abundance, albuminuria and urinary TGF- $\beta$ 1 in STZ-induced diabetic rats: implications for the development of diabetic nephropathy (DN). *Horm. Metab. Res.* (2001) 33: 1-6.
85. **Sahn, D.J., De Maria, A., Kisslo, J., Weyman, A.** Recommendations Regarding Quantitation in M-Mode Echocardiography: Results of a Survey of Echocardiography Measurements. *Circulation*, 56 (6), 1072-83, 1978.

86. **Schiller NB, Acquatella H, Ports TA, Drew D, Goerke J, Ringertz H, Silverman NH, Brundage B, Botvinick EH, Boswell R, Carlsson E, Parmley WW.** Left ventricular volume from paired biplane two-dimensional echocardiography. *Circulation*. 1979 Sep; 60(3): 547-55.
87. **Slama M, Ahn J, Peltier M, Maizel J, Chemla D, Varagic J, Susic D, Tribouilloy C, Frohlich ED.** Validation of echocardiographic and Doppler indexes of left ventricular relaxation in adult hypertensive and normotensive rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2004; 289:1131- 1136.
88. **Soares PP, da Nobrega AC, Ushizima MR, Irigoyen MC.** Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. *Auton Neurosci*. 2004 Jun 30; 113(1-2): 24-31.
89. **Souza SB, Flues K, Paulini J, Mostarda C, Rodrigues B, Souza LE, Irigoyen MC, De Angelis K.** Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. *Hypertension*. 2007 Oct; 50(4): 786-91.
90. **Stevens MJ, Raffel DM, Allman KC, Dayanikli F, Ficaro E, Sandford T, Wieland DM, Pfeifer MA, Schwaiger M.** Cardiac sympathetic dysinnervation in diabetes: implications for enhanced cardiovascular risk. *Circulation*. 1998; 98: 961-968.
91. **Su, DF; Miao, CY.** Blood pressure variability and organ damage. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 28(9) p.709-15, 2001.

92. **Task Force** of the European Society of Cardiology and North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation*. 1996; 95: 1043-1065.
93. **Tavares D.** Educacao conscientizadora do idoso diabetico, uma proposta de intervençao do enfermeiro. Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo - USP (tese). 1997 Ribeirao Preto.
94. **Teichholz LE, Cohen MV, Sonnenblick EH, Gorlin R.** Study of left ventricular geometry and function by B-scan ultrasonography in patients with and without asynergy. *New England Journal of Medicine*. 1974; 291:1220-1226.
95. **Tolins JP, Shultz PJ, Raj L, Brown DM, Mauer SM.** Abnormal renal hemodynamic response to reduced renal perfusion pressure in diabetic rats: role of NO. *Am J Physiol*, 1993; 265: F886-95.
96. **Tomlinson KC, Gardiner SM, Hebden RA, Bennett T.** Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev*. 1992; 44:103-50.
97. **Vadlamudi RV, Mcneill JH.** Effect of experimental diabetes on rat cardiac cAMP, phosphorylase, and inotropy. *Am J Physiol*. 1983; 244(6):H844-51.
98. **Van Vliet, B.N.; Hu, L.; Scott, T.; ChHFe, L.; Montani, J-P.** Cardiac hypertrophy and telemetered blood pressure 6 wk HFter baroreceptor



- denervation in normotensive rats. Am J Physiol. V. 271, p. R1759-69, 1996.
99. **Vinik AI, Holland MT, Le Beau JM, Liuzzi FJ, Stansberry KB, Colen LB.** Diabetic neuropathies. Diabetes Care. 1992 Dec; 15(12): 1926-75.
100. **WHO** - World Health Organization (on line). Prevalence of Diabetes Among Older Adults in America. 2005a. Disponivel em: <http://www.who.int/research/en/>.
101. **WHO** - World Health Organization (on line). Cardiovascular Disease and Control: Missed Opportunities. 2005b. Disponivel em: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/prevention\\_control/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/prevention_control/en/)
102. **Wichi R, Malfitano C, Rosa K, De Souza SB, Salemi V, Mostarda C, De Angelis K, Irigoyen MC.** Noninvasive and invasive evaluation of cardiac dysfunction in experimental diabetes in rodents. Cardiovasc Diabetol. 2007 Apr 26; 6: 14.
103. **Wichi, RB ; Souza, SB ; Morris, M ; Barretochaves, ML ; Irigoyen, MC .** Diabetes during pregnancy induces hypertension in offspring.. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, p. A642, 2004.
104. **Zanella, M. T.:** Microalbuminuria: Cardiovascular And Renal Risk Factors Underestimated In Clinical Practice. Arq Bras Endocrinol Metab, Apr. Vol.50, No.2, P.313-321. Issn 0004-2730; 2006.
105. **Zanetti, M.** O diabetes mellitus tipo1 em crianças e adolescentes: um desafio para as maes e profissionais de saude. Escola

de Enfermagem, Universidade de São Paulo - USP (tese). 1996: Ribeirao Preto.

106. **Zaslavsky LM, Pinotti AF, Gross JL.** Diastolic dysfunction and mortality in diabetic patients on hemodialysis: a 4.25-year controlled prospective study. *J Diabetes Complications*. 2005 Jul-Aug; 19(4): 194-200
107. **Ziegler D:** Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy: prognosis, diagnosis and treatment. *Diabetes Metab Rev* 10:339–383, 1994.