

**Bruno Rodrigues**

**Curso temporal das avaliações morfofuncionais e hemodinâmicas em ratos diabéticos e infartados**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental  
Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen

**São Paulo  
2008**

**Bruno Rodrigues**

**Curso temporal das avaliações morfofuncionais e hemodinâmicas em ratos diabéticos e infartados**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental  
Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen

**São Paulo  
2008**

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rodrigues, Bruno

Curso temporal das avaliações morfofuncionais e hemodinâmicas em ratos diabéticos e infartados / Bruno Rodrigues. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Maria Cláudia Irigoyen.

Descritores: 1.Ratos Wistar 2.Diabetes Mellitus 3.Infarto do miocárdio  
4.Funcção ventricular 5.Barorreflexo 6.Mortalidade

USP/FM/SBD-009/08

*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. Pela longa espera e compreensão durante o tempo fora de casa, não bastaria um muitíssimo obrigado. É por vocês que luto, que já chorei e choro de saudade. 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

Agradeço a minha vida a quem é a "Suprema Ciência da Sabedoria que a mente humana pode descobrir em cada um dos processos do universo estampados na natureza" (Pecotche, 1978), Deus.

Se enxerguei mais longe foi porque me apoiei nos ombros de gigantes (Isaac Newton).

À **Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen**, pela confiança, incentivo e dedicação incessante na minha formação acadêmica/científica durante todos estes anos. Mas, agradeço principalmente a amizade, carinho e sabedoria transmitida, mesmo nos momentos descontraídos.

À **Profa. Dra. Kátia De Angelis**, minha segunda orientadora, pela dedicação incansável na minha formação acadêmica/científica. Pelos dias e noites dedicados às correções dos trabalhos, disponibilidade e, acima de tudo, pelo exemplo de profissionalismo, mostrando que para os bons sempre há espaço.

À **Profa. Dra. Patrícia Chakur Brum**, pelo apoio, por colocar à disposição seu laboratório e seu tempo, além dos ensinamentos na discussão deste trabalho.

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

Ao meu sobrinho e afilhado **Théo**, que veio para completar nossas vidas.

Aos meus tios **Fernando e Márcia**, pela constante torcida por minha vitória.

À **Giovana**, pelo amor, carinho e companheirismo a mim dedicados em todos os momentos.

À **Profa. Dra. Alessandra Medeiros**, pelo apoio e disponibilidade na realização da técnica de Western blot e discussão dos resultados obtidos.

Ao **Kaleizu Teodoro Rosa**, pela execução dos ecocardiogramas, discussão dos resultados e, acima de tudo, pela amizade.

Aos meus grandes amigos **Cristiano Teixeira Mostarda e Geórgia Cândido**, pela grande colaboração na realização deste trabalho, mas, principalmente, pela amizade, força e atenção nos momentos de desabafo.

Ao amigo **Rodrigo Plentz**, pelo apoio e grande amizade durante estes anos. Amizade essa que pretendo cultivar por toda vida.

À **Raquel Nitrosi**, pela amizade e auxílio técnico na realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório **Edson, Leandro Ezequiel, Ivana, Janaína, Karin, Christiane, André, Matheus, Luciana, Mariana e Tatiana**, pela amizade e incentivo em todos os momentos.

A todos os amigos que foram ou são do Laboratório do Movimento Humano da Universidade São Judas Tadeu, **Marcelo, Diego, Lucinar, Márcio, Juliana, Janaína, Íris, Michelle e Natália**, pelo incentivo, força e companhia em todos os congressos.

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

A **Thânia e Sônia** da secretaria do programa de pós-graduação em Fisiopatologia Experimental, sempre solícitas no atendimento e esclarecimento das dúvidas.

À **Suellen**, pela infinita atenção e disponibilidade nas questões burocráticas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela concessão da bolsa de doutorado.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos de periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

Anexos

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Diabetes e doença cardiovascular.....	1
1.2. Infarto do miocárdio.....	6
1.3. Diabetes e infarto do miocárdio.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
3. MÉTODOS.....	17
3.1. Animais e grupos.....	17
3.2. Seqüência experimental.....	18
3.3. Diabetes induzido por estreptozotocina.....	19
3.4. Infarto do miocárdio.....	19
3.5. Avaliações ecocardiográficas.....	21
3.6. Teste de esforço máximo.....	25
3.7. Avaliação do consumo máximo de oxigênio (VO <sub>2</sub> máx.).....	26
3.8. Avaliações hemodinâmicas sistêmicas.....	27
3.8.1. Canulação.....	27



3.8.2. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....	28
3.9. Avaliação da sensibilidade barorreflexa.....	30
3.10. Avaliações diretas (invasivas) da função ventricular esquerda.....	32
3.10.1. Canulação do ventrículo esquerdo.....	32
3.10.2. Registro da pressão ventricular.....	32
3.11. Expressão de proteínas cardíacas.....	33
3.11.1. Preparação dos homogeneizados ventriculares.....	34
3.11.2. Western blot.....	35
3.12. Variabilidade no domínio do tempo e da frequência (análise espectral modelamento auto-regressivo).....	36
3.13. Análise estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	39
4.1. Avaliações metabólicas.....	39
4.1.1. Peso corporal.....	39
4.1.2. Glicemia.....	41
4.2. Avaliações cardio-respiratórias.....	42
4.2.1. Pressão arterial e frequência cardíaca.....	42
4.2.2. Consumo máximo de oxigênio (VO <sub>2</sub> máx.).....	43
4.3. Avaliações ventriculares.....	45
4.3.1. Avaliação ecocardiográfica da área de infarto do miocárdio.....	45
4.3.2. Avaliação ecocardiográfica da morfometria cardíaca.....	46
4.3.3. Avaliação ecocardiográfica da função sistólica.....	49
4.3.4. Avaliação ecocardiográfica da função diastólica.....	52

4.3.5. Avaliação ecocardiográfica da função global.....	53
4.3.6. Avaliação direta (invasiva) da função ventricular.....	54
4.3.7. Expressão de proteínas cardíacas envolvidas na regulação intracelular de $Ca^{2+}$ .....	58
4.4. Avaliações da função autonômica cardiovascular.....	68
4.4.1. Sensibilidade barorreflexa.....	68
4.4.2. Variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial sistólica .....	71
4.5. Avaliação da mortalidade.....	81
5. DISCUSSÃO.....	82
5.1. Avaliações metabólicas.....	83
5.2. Avaliações cardio-respiratórias .....	84
5.3. Avaliações ventriculares.....	90
5.3.1. Morfometria e função cardíaca: avaliações não invasivas e invasivas da função ventricular esquerda.....	90
5.3.2. Expressão de proteínas cardíacas relacionadas à homeostase do $Ca^{2+}$ intracelular .....	99
5.4. Avaliações da função autonômica.....	107
5.5. Avaliação da mortalidade.....	116
5.6. Considerações finais.....	117
6. REFERÊNCIAS.....	120

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C – grupo controle

D – grupo diabético

I – grupo infartado

DI – grupo diabético/infartado

VE – ventrículo esquerdo

DM – diabetes mellitus

STZ – estreptozotocina

IM – infarto do miocárdio

MVE - massa do ventrículo esquerdo

VEDIA - cavidade do ventrículo esquerdo em diástole

EMVE – eixo maior do ventrículo esquerdo

AVE – área do ventrículo esquerdo

FE - fração de ejeção

VEC - velocidade de encurtamento circunferencial

TRIV - tempo de relaxamento isovolumétrico

TDE - tempo de desaceleração da onda E

IDM - índice de desempenho miocárdico

VO<sub>2</sub> máx – consumo máximo de oxigênio

+dP/dt – derivada de contração do ventrículo esquerdo

- dP/dt – derivada de relaxamento do ventrículo esquerdo

SERCA2 – Ca<sup>2+</sup> ATPase do retículo sarcoplasmático

RS – retículo sarcoplasmático

PLN – fosfolambam

fosfo-Ser<sup>16</sup>-PLN – fosfolambam fosforilado na serina 16

fosfo-Tre<sup>17</sup>-PLN – fosfolambam fosforilado na treonina 17

NCX – trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>

PP1 – proteína fosfatase 1

VFC – variabilidade da frequência cardíaca

VPAS – variabilidade da pressão arterial sistólica

SDNN – média dos desvios padrões

IBR – índice de bradicardia reflexa

ITR – índice de taquicardia reflexa

LF – banda de baixa frequência

HF – banda de alta frequência

EPM – erro padrão da média

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ilustração e foto do infarto do miocárdio experimental em ratos .....	20
<b>Figura 2.</b> Esquema demonstrativo da realização da medida do consumo máximo de oxigênio (VO <sub>2</sub> máx.) concomitante ao teste de esforço máximo em ratos.....	27
<b>Figura 3.</b> Desenho da canulação da artéria e veia femural em posição anátomo-cirúrgica .....	28
<b>Figura 4.</b> Sistema de registro da pressão arterial e frequência cardíaca .....	29
<b>Figura 5.</b> Registro demonstrativo da pressão arterial e frequência cardíaca antes e após a administração de drogas vasoativas.....	31
<b>Figura 6.</b> Peso corporal (gramas) do início (dia 1) até o final (90 dias) do protocolo experimental nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	40
<b>Figura 7.</b> Glicemia (mg/dL) avaliada aos 15, 30, 60 e 90 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	42
<b>Figura 8.</b> Consumo máximo de oxigênio (VO <sub>2</sub> máx.) (ml/Kg/min <sup>-1</sup> ) avaliado aos 15, 30, 60 e 90 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	45
<b>Figura 9.</b> Área de infarto representada pelo % de parede do ventrículo esquerdo acinético ou discinético, nos animais dos grupos infartado (I) e diabético/infartado (DI), em suas avaliações inicial (1 a 2 dias após o IM) e final (90 dias).....	46
<b>Figura 10.</b> Eixo maior do ventrículo esquerdo (EMVE, cm) nos grupos infartado (I) e diabético/infartado (DI), nas avaliações inicial e final.....	48

<b>Figura 11.</b> Área do ventrículo esquerdo em diástole (AVE, cm <sup>2</sup> ) nos grupos infartado (I) e diabético/infartado (DI), nas avaliações inicial e final. ....	49
<b>Figura 12.</b> Fração de ejeção (FE, %) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI), nas avaliações inicial e final. ....	51
<b>Figura 13.</b> Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV, ms) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI), nas avaliações inicial e final.... .....	53
<b>Figura 14.</b> Índice de desempenho miocárdico (IDM, em UA) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI), nas avaliações inicial e final.... .....	54
<b>Figura 15.</b> Correlação positiva entre a derivada de contração do ventrículo esquerdo (+dP/dt, em mmHg/seg) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FE, em %) nos grupos estudados. ....	57
<b>Figura 16.</b> Correlação positiva entre cavidade do ventrículo esquerdo em diástole (VEDIA, em cm) e pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDF, em mmHg) nos grupos estudados. ....	58

<b>Figura 17.</b> Auto-radiografias representativas da expressão das proteínas estudadas: Ca <sup>2+</sup> ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2), fosfolambam (PLN), fosfolambam fosforilado na serina 16 (fosfo-Ser <sup>16</sup> -PLN), fosfolambam fosforilado na treonina 17 (fosfo-Tre <sup>17</sup> -PLN), proteína fosfatase 1 (PP1) e trocador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> (NCX) em homogeneizado ventricular dos grupos controle (C), diabético (D), infartado e diabético/infartado (DI).....	59
<b>Figura 18.</b> Expressão da Ca <sup>2+</sup> -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2, % do controle) em homogeneizado ventricular dos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	61
<b>Figura 19.</b> Correlação positiva entre a expressão da Ca <sup>2+</sup> -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2, % do controle) e fração de ejeção (FE, em %) nos grupos estudados. ....	62
<b>Figura 20.</b> Correlação positiva entre a expressão da Ca <sup>2+</sup> ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2, % do controle) e derivada de contração do VE (+dP/dt, em mmHg/seg) nos grupos estudados. ....	62
<b>Figura 21.</b> Expressão do trocador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> (NCX) em homogeneizado ventricular dos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	63
<b>Figura 22.</b> Razão da expressão da Ca <sup>2+</sup> -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2) e trocador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> (NCX) em homogeneizado ventricular dos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	64

<b>Figura 23.</b> Expressão da fosfolambam total (PLN, % do controle) em homogeneizado ventricular dos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	65
<b>Figura 24.</b> Expressão de fosfolambam fosforilado na serina 16 (fosfo-Ser <sup>16</sup> -PLN/PLN, % do controle) em homogeneizado ventricular dos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	66
<b>Figura 25.</b> Expressão de fosfolambam fosforilado na treonina 17 (fosfo-Tre17-PLN/PLN, % do controle) em homogeneizado ventricular dos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	66
<b>Figura 26.</b> Expressão da proteína fosfatase 1 (PP1, % do controle) em homogeneizado ventricular dos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	67
<b>Figura 27.</b> Índice de bradicardia reflexa (IBR) (bpm/mmHg) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	69
<b>Figura 28.</b> Índice de taquicardia reflexa (ITR) (bpm/mmHg) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	70
<b>Figura 29.</b> Correlação positiva entre índice de bradicardia reflexa (IBR, em bpm/mmHg) e o consumo máximo de oxigênio (VO <sub>2</sub> máx., em ml/Kg/min <sup>-1</sup> ) nos grupos estudados. ....	71
<b>Figura 30.</b> Média dos desvios padrões do intervalo de pulso (SDNN, expressa em bpm) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	73
<b>Figura 31.</b> Variância total do intervalo de pulso (expressa em ms <sup>2</sup> ) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	74



<b>Figura 32.</b> Banda de baixa frequência (LF, em $ms^2$ ) do intervalo de pulso nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	75
<b>Figura 33.</b> Banda de alta frequência do intervalo de pulso (HF, em $ms^2$ ) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	75
<b>Figura 34.</b> Correlação positiva entre a banda de baixa frequência (LF, em $ms^2$ ) do intervalo de pulso e índice de bradicardia reflexa (IBR, em bpm/mmHg) nos grupos estudados .....	76
<b>Figura 35.</b> Correlação positiva entre a banda de baixa frequência (LF, em $ms^2$ ) do intervalo de pulso e o consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$ máx., mL/Kg/ $min^{-1}$ ) nos grupos estudados .....	77
<b>Figura 36.</b> Média dos desvios padrões (SDNN) da pressão arterial sistólica (expressa em mmHg) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). .....	79
<b>Figura 37.</b> Variância total da pressão arterial sistólica (expressa em $mmHg^2$ ) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	79
<b>Figura 38.</b> Banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica (LF, em $mmHg^2$ ) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	80
<b>Figura 39.</b> Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. Observe os percentuais de mortalidade nos grupos controle (C: 0%), diabético (D: 45%), infartado (I: 63%) e diabético/infartado (74%) durante 90 dias de protocolo.....	81

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Peso corporal (gramas) no início (dia 1) e ao final do protocolo experimental (90 dias) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI) .....	40
<b>Tabela 2.</b> Glicemia (mg/dL) aos 15 e aos 90 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).....	41
<b>Tabela 3.</b> Valores de pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM) e frequência cardíaca (FC) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI) .....	43
<b>Tabela 4.</b> Consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$ máx.) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI) avaliados aos 15 e aos 90 dias.....	44
<b>Tabela 5.</b> Massa do ventrículo esquerdo (MVE, absoluta e corrigida) e cavidade do ventrículo esquerdo em diástole (VEDIA), nos animais controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI), nas avaliações inicial (1 a 2 dias após o IM) e final (90 dias).....	47
<b>Tabela 6.</b> Fração de ejeção (FE) e velocidade de encurtamento circunferencial (VEC) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético infartado (DI) .....	51

<b>Tabela 7.</b> Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e tempo de desaceleração da onda E (TDE) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético infartado (DI) .....	52
<b>Tabela 8.</b> Pressão sistólica (PSVE), pressão diastólica final (PDF), frequência cardíaca (FC) e derivadas de contração (+dP/dt) e relaxamento (- dP/dt ) do ventrículo esquerdo, no período basal, 3º minuto da sobrecarga de volume (sob) e 3º minuto da recuperação (rec) deste procedimento, nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI) .....	56
<b>Tabela 9.</b> Expressão de proteínas cardíacas envolvidas na recaptação de $Ca^{2+}$ pelo retículo sarcoplasmático em homogeneizados ventriculares dos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI) .....	60
<b>Tabela 10.</b> Índices de bradicardia (IBR) e de taquicardia (ITR) reflexas (bpm/mmHg) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI) .....	69
<b>Tabela 11.</b> Valores da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e da frequência nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI) .....	72
<b>Tabela 12.</b> Valores da variabilidade da pressão arterial sistólica no domínio do tempo e da frequência nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI) .....	78

## RESUMO

**Rodrigues B.** *Curso temporal das avaliações morfofuncionais e hemodinâmicas em ratos diabéticos e infartados [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 147p.

Estudos experimentais envolvendo animais diabéticos submetidos ao infarto do miocárdio (IM) ainda são bastante controversos no que diz respeito às respostas do coração diabético à injúria isquêmica. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do IM experimental nas alterações ventriculares, cardio-respiratórias e autonômicas de ratos diabéticos por estreptozotocina. Foram utilizados ratos Wistar machos (230 a 260g) divididos em 4 grupos experimentais: controle (C, n=8), diabético (D, n=8), infartado (I, n=8) e diabético/infartado (DI, n=8). Após 15 dias de indução do diabetes (DM) por estreptozotocina (STZ) ou injeção de tampão citrato foi realizada a ligadura da artéria coronária esquerda nos grupos I e DI. Foram realizadas medidas do consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$ máx) e glicemia aos 15, 30, 60 e 90 dias de protocolo. Após 1 a 2 dias do IM (inicial) e aos 90 dias (final) de protocolo foram realizadas avaliações ecocardiográficas. A partir dos 90 dias de protocolo foram realizados registros diretos da pressão arterial (PA) e avaliações da sensibilidade barorreflexa, da modulação autonômica cardiovascular (variabilidade da frequência cardíaca e da PA sistólica) e da função ventricular pela cateterização do ventrículo esquerdo (VE), bem como medidas da expressão das proteínas cardíacas relacionadas à homeostasia do  $Ca^{2+}$  intracelular por Western blot. Os grupos diabéticos (D e DI) apresentaram aumento da glicemia e redução do peso corporal, da PA e da frequência

cardíaca quando comparados com os grupos não diabéticos (C e I). O  $\text{VO}_2$  máx. estava reduzido no grupo D em relação ao grupo C e também nos grupos infartados (I e DI) quando comparados aos grupos não infartados (C e D) em todos os tempos avaliados. A área de IM foi semelhante entre os grupos infartados no início ( $\sim 40 \pm 3\%$ ) e no final do protocolo ( $\sim 45 \pm 5\%$ ). A área do IM, o eixo maior do VE e área do VE na diástole foram maiores na avaliação final em relação à avaliação inicial no grupo I, sendo que essas diferenças não foram observadas no grupo DI. A cavidade do VE e a massa do VE estavam aumentadas nos grupos I e DI em relação aos grupos C e D na avaliação final. O grupo DI apresentou atenuada disfunção sistólica nas avaliações finais (invasivas e não invasivas) quando comparado com I (fração de ejeção:  $\text{DI} = 55 \pm 5\%$  vs.  $\text{I} = 42 \pm 3\%$ ; velocidade de encurtamento circunferencial:  $\text{DI} = 43 \pm 1$  vs.  $\text{I} = 34 \pm 2$  circ/s  $10^{-4}$ ; derivada de contração do VE:  $\text{DI} = 5.402 \pm 752$  vs.  $\text{I} = 4.642 \pm 457$  mmHg/seg). Os grupos D, I e DI apresentaram disfunção diastólica, avaliada pelos tempos de relaxamento isovolumétrico e de desaceleração da onda E, quando comparados com o grupo C. Adicionalmente, a pressão diastólica final e o índice de desempenho miocárdico estavam aumentados nos grupos infartados (I e DI) em relação ao grupo C ( $5 \pm 0,3$  mmHg e  $0,39 \pm 0,01$ ), mas reduzidos no grupo DI ( $12 \pm 3$  mmHg e  $0,45 \pm 0,01$ , respectivamente) em relação ao grupo I ( $20 \pm 2$  mmHg e  $0,57 \pm 0,04$ , respectivamente). Nas avaliações moleculares, o grupo DI apresentou aumento da razão SERCA2/trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (48%), expressão de fosfolambam fosforilado na serina 16 (187%) e treonina 17 (243%), bem como redução da expressão do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (-164%), fosfolambam (-119%) e da proteína fosfatase 1 (-104%) em relação aos animais do grupo I. Disfunção autonômica, avaliada

pela sensibilidade barorreflexa e pela variabilidade da FC (VFC) e da PA sistólica (VPAS), foram observadas nos grupos D, I e DI em relação ao grupo C. Apesar da melhor função sistólica e do perfil molecular das proteínas relacionadas à homeostase do  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, o grupo DI apresentou maior disfunção autonômica quando comparado com o grupo I, evidenciado pela menor sensibilidade barorreflexa (índice de bradicardia reflexa), pela reduzida VFC nos domínios do tempo (SDNN) e da frequência (banda de baixa frequência do intervalo de pulso), bem como pela exacerbada redução do componente de baixa frequência da VPAS. Ao final dos 90 dias de protocolo a mortalidade foi semelhante entre os grupos I (63%) e DI (74%). Dessa forma, os resultados obtidos no presente trabalho fornecem evidências de que a presença de diabetes atenua a clássica disfunção ventricular (sistólica, diastólica e global) induzida pela isquemia miocárdica em ratos normais, o que pode estar associado a alterações compensatórias nas proteínas relacionadas à homeostase do cálcio intracelular. Por outro lado, a associação entre diabetes e infarto do miocárdio induz exacerbção da disfunção autonômica cardiovascular observada nos ratos somente diabéticos ou infartados. Estes achados, em conjunto, sugerem que a disfunção autonômica, mesmo em presença de um menor comprometimento da estrutura e funções ventriculares, possa ter contribuído para a mortalidade semelhante entre o grupo somente infartado e o grupo diabético infartado, o que reforça a importância do controle autonômico cardiovascular no prognóstico de indivíduos portadores de diabetes.

Descritores: Ratos Wistar, Diabetes mellitus, Infarto do miocárdio, Função ventricular, Barorreflexo, Mortalidade.

## ABSTRACT

**Rodrigues B.** *Time course of morphofunctional and hemodynamic evaluations in diabetic and infarcted rats* [thesis]. Sao Paulo: Faculty of Medicine, University of Sao Paulo (Brazil); 2008. 147p.

Experimental studies in diabetic animals submitted to myocardial infarction (MI) remain controversial in regard to the cardiac responses to ischemic injury. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of experimental MI on ventricular, cardio-respiratory and autonomic abnormalities in streptozotocin (STZ) diabetic rats. Male Wistar rats (230-260g) were randomly assigned to 4 experimental groups: control (C, n=8), diabetic (D, n=8), infarcted (I, n=8) and diabetic/infarcted (DI, n=8). After 15 days of diabetes induction by streptozotocin or citrate buffer injection, I and DI animals were submitted to left coronary occlusion. Maximal oxygen uptake ( $VO_2$  max) and blood glucose were evaluated on days 15, 30, 60 and 90. Echocardiographic evaluations were performed on days 1 or 2 (initial) and 90 (final) after MI. At the end of the experimental protocol (90 days), arterial pressure (AP), baroreflex sensitivity, cardiovascular autonomic modulation (heart rate variability and systolic arterial pressure variability), ventricular function and the expression of cardiac proteins involved with intracellular  $Ca^{2+}$  homeostasis were evaluated by Western blot. Diabetic groups (D and DI) presented higher blood glucose and lower body weight and heart rate than non-diabetic groups (C and I).  $VO_2$  max. was reduced on D group as compared with C group, as well as in infarcted groups (I and DI) as compared with non-infarcted ones (C and D). MI area was

similar between all infarcted groups at the beginning ( $\sim 40 \pm 3\%$ ) and at the end of experimental protocol ( $\sim 45 \pm 5\%$ ). However, I group presented greater MI area, long-axis of left ventricle (LV) and diastolic LV area at the final evaluation when compared to the initial period, but these adaptations were not observed on DI group. LV cavity and mass were enhanced in I and DI groups compared with C and D groups at the end of experimental protocol. Systolic dysfunction was attenuated in DI group at the end of experimental protocol as compared with I group (ejection fraction: DI= $55 \pm 5\%$  vs. I= $42 \pm 3\%$ ; velocity of circumferential fiber shortening: DI= $43 \pm 1$  vs. I= $34 \pm 2$  circ/sec  $10^{-4}$ ; maximum rate of LV pressure rise (+dP/dt): DI= $5.402 \pm 752$  vs. I= $4.642 \pm 457$  mmHg/sec). D, I e DI groups presented diastolic dysfunction, evidenced by isovolumetric relaxation time and E wave deceleration, as compared with C group. LV end diastolic pressure and myocardial performance index were higher in infarcted groups (I and D) than in C group ( $5 \pm 0.3$  mmHg and  $0.39 \pm 0.01$ ), but they were reduced in DI group ( $12 \pm 3$  mmHg and  $0.45 \pm 0.01$ , respectively) compared with I group ( $20 \pm 2$  mmHg and  $0.57 \pm 0.04$ , respectively). DI animals presented higher SERCA2/Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger ratio (48%), higher phosphorylated phospholamban at Serine 16 (187%) and at Threonine 17 (243%), and lower expression levels of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger (-164%), phospholamban (-119%) and phosphatase protein 1 (-104%) than I group. Autonomic dysfunction, evaluated by baroreflex sensitivity and by heart rate variability (HRV) and systolic AP variability (APV), was observed in D, I and DI groups, compared with C group. Despite it was observed an improvement on systolic function and on molecular profile of intracellular Ca<sup>+2</sup> proteins homeostasis, DI group presented greater autonomic



dysfunction as compared with I group, verified by reduced baroreflex sensitivity (bradycardic reflex index), reduced HRV on time (SDNN) and frequency domains (low frequency band of pulse interval), as well as by the marked reduction on low frequency component of APV. At the end of experimental protocol (90 days), mortality was similar between I (63%) and DI (74%) groups. Thus, the results of this study show that diabetes attenuates the classic ventricle dysfunction (systolic, diastolic and global) induced by myocardial ischemia in normal rats. This adaptation might be related with compensatory alterations in proteins involved in the intracellular calcium homeostasis. On the other hand, the association of diabetes and MI was shown to worsen the cardiovascular autonomic dysfunction observed in diabetic or infarcted rats. Together, these findings suggest that the autonomic dysfunction, even in presence of reduced damage in ventricle and structure function, could have contributed to the similar mortality between infarcted and diabetic infarcted groups, reinforcing the importance of cardiovascular autonomic control in the prognosis of diabetic patients.

Descriptors: Wistar rats, Diabetes mellitus, Myocardial infarction, Ventricular function, Baroreflex, Mortality.

## ***1. INTRODUÇÃO***

### ***1.1. Diabetes e doença cardiovascular***

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio que consiste na resposta secretória defeituosa ou deficiente de insulina, manifestando-se pela utilização inadequada de glicose pelos tecidos com conseqüente hiperglicemia. Os distúrbios do metabolismo da glicose podem causar complicações que envolvem doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão arterial, doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca (IC), sendo que 75% dos pacientes diabéticos morrem por algum evento cardiovascular (Kannel et al., 1974; Giugliano et al., 1996; Gu et al., 1999).

De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde, só nos países do continente americano a prevalência da população diabética poderá chegar a 64 milhões até o ano de 2025. No Brasil, estes números chegarão em torno de 11,6 milhões até a mesma data (WHO, 2005a).

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 da doença, existem outros, talvez de cunho sócio-econômico, que aumentam sua morbi-mortalidade. De forma casual, 68% dos casos de diabetes são diagnosticados geralmente após a manifestação clínica de alguma de suas complicações crônicas, 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). A causa mais freqüente de mortalidade no diabetes é a doença cardiovascular, sendo a principal responsável pelo pior prognóstico nesses pacientes (Muir et al., 1992).

De fato, 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.

A neuropatia autonômica é uma complicação freqüente do diabetes mellitus e está associada à alta morbidade e mortalidade em pacientes sintomáticos (Ewing et al., 1980), afetando a modulação autonômica do nodo sinusal e reduzindo a variabilidade da freqüência cardíaca (VFC) (Fazan et al., 1997). O aumento da mortalidade pode estar relacionado a alterações no controle cardiovascular, incluindo atenuação do controle reflexo autonômico levando à hipotensão ortostática, infarto do miocárdio, em muitos casos sem 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 (VE), o que facilitaria as arritmias malignas por alterar a estabilidade elétrica e/ou comprometer o fluxo sanguíneo miocárdico (Stevens et al., 1998).

Modelos experimentais pelo uso de agentes diabetogênicos, como a estreptozotocina (STZ) e o aloxano, têm sido utilizados na indução do diabetes experimental em ratos com o objetivo de estudar as alterações decorrentes desta doença na função ventricular esquerda (Wichi et al., 2007; Borges et al., 2006), bem como do sistema nervoso autonômico (Junod et al., 1969; Vadlamudi & McNeill, 1983; Maeda et al., 1995a, De Angelis et al., 2000b; De Angelis et al., 2007).

Ratos diabéticos por STZ apresentam um quadro característico, semelhante ao observado em pacientes com diabetes não controlado, como hiperglicemia, hipoinsulinemia, glicosúria, poliúria, assim como perda de peso (Tomlinson & Yusof, 1981; Dall'Ago et al., 1997; Schaan et al., 1997; De Angelis et al., 2007). 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 (STZ) tem sido usado por vários investigadores na busca de melhor compreensão das alterações da cardiomiopatia diabética e do controle autonômico.

Em nosso grupo, temos utilizado o modelo experimental de diabetes por STZ no estudo das disfunções do controle autonômico do sistema cardiovascular. Estudos de nosso laboratório verificaram redução da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC), desde 5 até 80 dias após a indução do DM (Schaan et al., 1997; Dall'Ago et al., 1997; Maeda et al., 1995a; Maeda et al., 1995b; De Angelis et al., 2000b). Os mecanismos envolvidos nestas disfunções ainda não estão perfeitamente esclarecidos, mas existem evidências consistentes do envolvimento de alterações na FC intrínseca, no

tônus vagal e no controle reflexo da FC (barorreflexo e quimiorreflexo) neste prejuízo cardiovascular (De Angelis et al., 2002). De fato, alterações degenerativas em neurônios autonômicos foram observadas de 3 dias (Monckton & Pehowich, 1980), até várias semanas após a administração de STZ em ratos (Schmidt et al., 1983).

A avaliação da sensibilidade do barorreflexo, uma excelente medida da função autonômica, tem apresentado dados controversos na literatura em indivíduos diabéticos. O reflexo pressorreceptor é considerado um sistema de controle de alto ganho, pois mantém a pressão arterial dentro de limites normais em períodos de segundos a minutos. Dessa forma, os pressorreceptores modulam o tônus simpático e parassimpático para vasos e coração, participando, portanto, da homeostase hemodinâmica. Trabalhos com ratos diabéticos mostram redução (Chang & Lund, 1986; Maeda et al., 1995ab, Dall'Ago et al., 1997; Harthmann et al., 2007) e aumento (Homma et al., 1993) da sensibilidade dos pressorreceptores em corrigir alterações bruscas da pressão arterial. Possivelmente estas diferenças se devem não só ao agente diabetogênico usado, mas também ao método de avaliação cardiovascular, e/ou ao tempo de diabetes quando da avaliação.

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 e clínicos. 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). Em nosso laboratório, recentemente, demonstramos que ratos diabéticos por STZ apresentaram disfunção sistólica e

diastólica avaliadas pela cateterização do VE e pelo ecodopplercardiograma após 30 dias de indução. Além disso, observamos, nesta fase do diabetes experimental, que estes animais tinham reduzida capacidade de ajuste à sobrecarga de volume (Wichi et al., 2007). Alterações ventriculares também têm sido encontradas em estudos ecocardiográficos com portadores de diabetes assintomáticos. Em pacientes diabéticos normotensos, tem sido relatado hipertrofia e, sistematicamente, comprometimento da função diastólica do VE, principalmente em relação a alterações de relaxamento ventricular (Boyer et al., 2004). Além disso, a queda da capacidade de esforço, bem como do  $VO_2$  máx. foi recentemente observado pelo nosso laboratório em ratos diabéticos por STZ quando comparados aos animais controles (Rodrigues et al., 2007).

Considerando que a cardiomiopatia pode afetar desfavoravelmente o prognóstico de portadores de diabetes, informações sobre as alterações da função ventricular esquerda são fundamentais para o entendimento dos mecanismos envolvidos nessa disfunção, que aumenta o risco de infarto do miocárdio (IM) e/ou IC pacientes.

## ***1.2. Infarto do miocárdio***

As doenças cardiovasculares são responsáveis por 16,7 milhões de mortes por ano em todo o mundo. Dentro destas, 7,2 milhões correspondem a doenças coronarianas cujos principais fatores de risco são: fumo, obesidade, hipertensão arterial, disposição hereditária, processos inflamatórios, inatividade física e diabetes. Segundo estimativas, este problema deve crescer nos próximos anos devido ao envelhecimento da população e ao aumento das taxas de sobrevivência após um evento isquêmico (WHO, 2005b). Atualmente, na maioria dos países, o IM é a principal causa de morbidade e mortalidade (Diretrizes (II) para o diagnóstico e tratamento da Insuficiência Cardíaca, 2002).

Durante as primeiras décadas do século passado, a oclusão coronariana aguda conduzia usualmente à morte. Já na terceira década, a incidência de infarto agudo do miocárdio cresceu em proporções alarmantes, sendo na metade do século a mais comum causa de morte nos hospitais de países industrializados (Julian & Braunwald, 1994). Durante as décadas de 80 e 90, novos conhecimentos modificaram o entendimento da patologia do IM. Novas informações foram obtidas por meios de pesquisas realizadas em humanos e em animais de experimentação, o que possibilitou o diagnóstico do infarto por meio da avaliação clínica, análises eletrocardiográficas e dosagens de enzimas específicas. Além disso, avanços da clínica médica possibilitaram melhor atendimento ao paciente com IM, reduzindo a mortalidade observada anteriormente (Julian & Braunwald, 1994).

O IM, em sua grande maioria, resulta de aterosclerose das artérias coronárias, placas que causam o estreitamento luminal da árvore coronária, geralmente com

trombose coronária sobreposta. Ocorre então, agregação plaquetária e depósito de fibrina, posteriormente culminando na formação do trombo agudo evoluindo para o IM. Portanto, o IM é um processo dinâmico que não ocorre instantaneamente, mas evolui progressivamente durante algumas horas. Este causa alterações importantes na estrutura cardíaca, sendo a cicatriz a mais aparente.

Dentre os fatores determinantes da função ventricular esquerda após um evento isquêmico podemos citar: o tamanho do infarto, a localização, a disfunção isquêmica, a contratilidade do miocárdio normal, a complacência ventricular, a isquemia subendocárdica, a impedância aórtica e a capacitância venosa (pré-carga) (Cohn, 1989).

Se uma grande massa ventricular for submetida à lesão isquêmica, a função de bomba do VE torna-se deprimida, o débito cardíaco, o volume sistólico, a PA e o pico de  $dP/dt$  diminuem e, em contraposição, a pressão diastólica final do VE (PDF) aumenta (Pfeffer et al., 1979, De Felice et al., 1989). A depressão da função cardíaca pós IM está diretamente relacionada à extensão da lesão isquêmica no VE e ao grau de aumento da PDF que é, talvez, um dos maiores preditores da mortalidade após o IM. No entanto, a medida da função miocárdica mais utilizada clinicamente na fase crônica do IM é a fração de ejeção do VE, sendo esta avaliação empregada para a estratificação de risco dos pacientes (White et al., 1987; Dutcher et al., 2007).

O IM inicia um processo de remodelamento ventricular, o qual é caracterizado pela progressiva dilatação do VE, rearranjo da estrutura da parede ventricular, hipertrofia e aumento na massa muscular sem um aumento na espessura da parede (Pfeffer et al., 1990). O remodelamento ventricular, em um primeiro momento é benéfico para o sistema cardio-circulatório, possibilitando a manutenção da demanda; no



entanto, cronicamente torna-se prejudicial levando à disfunção e falência ventriculares. Na fase crônica do IM, a severidade dos sintomas de disfunção do VE parece estar associada com a sobrevida do paciente (Califf et al., 1992). Os mecanismos compensatórios utilizados cronicamente para manter a perfusão sistêmica após o IM são: utilização da reserva sistólica (aumento da contratilidade) e/ou diastólica (mecanismo de Frank-Starling) e alterações neurohumorais; que, ao mesmo tempo em que são benéficas, podem induzir alterações na massa, volume e complacência ventricular, além de disfunção ventricular, levando a um quadro de IC (Colucci & Brounwald, 2003).

A IC em animais de experimentação, induzido pelo IM por ligadura da artéria coronária, vem sendo amplamente utilizada por muitos pesquisadores na busca da melhor compreensão da evolução do IM e suas complicações. Devido a sua relevância clínica e a uma relativa facilidade metodológica, a IC induzida pelo IM é um dos modelos mais utilizados nos trabalhos com animais de pequeno porte (Elser et al., 1995). Muitos investigadores têm determinado os parâmetros hemodinâmicos de ratos em diferentes tempos de IM. Diminuição da pressão sistólica do VE e da velocidade de contração (+dP/dt do VE), hipotensão e aumento da PDF do VE são achados constantes neste modelo (Fletcher et al., 1981).

Em nosso laboratório, De Angelis et al. (2002) observaram que animais infartados (56 dias) apresentavam hipotensão em relação aos controles conforme previamente demonstrado na literatura por Mill et al. (1991), Meyrelles et al. (1994) e De Felice et al. (1989). Além disto, a contratilidade ventricular (+dP/dt) mostrou-se reduzida e a PDF elevada (~15 mmHg) nos animais infartados em relação aos controles.

O decréscimo do desempenho da célula cardíaca na IC é determinado por alterações bioquímicas decorrentes de modificações na expressão de proteínas do cardiomiócito que participam da regulação do processo de excitação-contracção e do relaxamento da célula cardíaca (Balke & Shorofsky, 1998). O  $\text{Ca}^{2+}$  é altamente tóxico para qualquer célula, no entanto, representa o maior mensageiro intracelular, regulando diversas atividades, tais como contratilidade, metabolismo, transporte, secreção e transcrição (Zaugg & Schaub, 2004). A sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  para diferentes respostas celulares depende da manutenção da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, a qual é fortemente controlada pela cascata de sinalização adrenérgica. Vários canais, bombas e trocadores são responsáveis pela manutenção de altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico durante a sístole e baixas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  durante a diástole (Zaugg & Schaub, 2004).

A SERCA2 é uma  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do retículo sarcoplasmático (RS) responsável pela recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$ . Assim, a diminuição do número dessas bombas reduz a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico pelo RS, aumentando a ligação  $\text{Ca}^{2+}$ -troponina C, o que dificulta o fenômeno de relaxamento miocárdico. No miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca há diminuição da atividade e expressão da SERCA2 o que resulta em uma menor recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico para o RS (Hajjar et al., 1998; Schwinger et al., 1999). A SERCA2 é uma proteína de 110 kDa e encontra-se sob controle direto da proteína fosfolambam (PLN) (25 kDa, na forma de pentâmero) que, por sua vez, encontra-se sob controle da PKA e da proteína quinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina quinase (CAMKII). Portanto, outro mecanismo que poderia estar envolvido na menor recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS no miocárdio de indivíduos com IC é o aumento da

expressão ou a diminuição da fosforilação do PLN. O PLN, quando defosforilado, inibe a atividade da SERCA2 diminuindo sua afinidade pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . Mediante a estimulação das vias adrenérgicas, a PKA fosforila o PLN, no resíduo da serina16, e a CAMKII no resíduo da treonina 17. Quando fosforilado, o PLN deixa de inibir a SERCA2. Alguns estudos têm demonstrado diminuição na expressão (Kiss et al., 1995) e outros aumento na atividade (Meyer et al., 1995; Schwinger et al., 1999) de fosfolambam na IC. Esta controvérsia pode estar relacionada às diferentes etiologias da IC.

Outra proteína importante para a redução do  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol é o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . O  $\text{Ca}^{2+}$  do meio intracelular precisa ser reduzido para que o processo de relaxamento ocorra adequadamente e há dois mecanismos possíveis de redução do  $\text{Ca}^{2+}$ : um deles refere-se a sua recaptação pelo RS através da SERCA2 e o outro seria a sua extrusão da célula através do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Este mecanismo pode ser considerado o mais importante de extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo sarcolema (Lu et al., 2002; Mace et al., 2003). Alguns trabalhos na literatura têm demonstrado que a expressão deste trocador está aumentada na IC, tanto em animais experimentais (Hattem et al., 1994; Lu et al., 2002; Studer et al., 1997), como em humanos (Studer et al., 1994), o que colabora para a diminuição do conteúdo sarcoplasmático de  $\text{Ca}^{2+}$ , conseqüentemente, ocorre o prejuízo da função sistólica. Por outro lado, alguns trabalhos não têm observado alterações na expressão deste trocador (Hasenfuss et al., 1999), ou mesmo diminuição na expressão (Yao et al., 1998). Essas divergências entre os estudos podem se dar pela utilização de diferentes protocolos experimentais, modelos de IC, etiologia e espécies estudadas.

Assim, a homeostasia do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular na IC tem sido objeto de vários estudos na literatura, devido à relativa falta de consenso em algumas variáveis

moleculares. Além disso, o sistema nervoso simpático parece estar envolvido tanto no aumento das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular na diástole (alteração no relaxamento do músculo cardíaco- lusitropismo) (Dash et al., 2001; Hajjar et al., 1998; Kiss et al., 1995) como na redução de sua liberação durante a sístole (alteração na contratilidade- inotropismo) (Marks, 2000) observados no coração insuficiente.

Além das alterações funcionais e moleculares, as manifestações periféricas da IC, como disfunção endotelial, alterações no perfil metabólico e morfológico dos músculos esqueléticos, além de distúrbios no controle ventilatório, são determinantes para o aparecimento de sintomas como a intolerância ao esforço físico e do  $\text{VO}_2$  máx, decorrentes do comprometimento da perfusão periférica e do metabolismo celular (Drexler et al., 1992; Ferrari & Ceconi, 1998)

Considerando a existência de alterações autonômicas no início do IM, Webb et al. (1972) observaram que 92% dos pacientes apresentavam desequilíbrio autonômico. Esses mesmos autores verificaram que a bradicardia e a hipotensão ocorriam com maior frequência em pacientes com infarto da parede ínfero-posterior do VE, nos quais a ação parassimpática era provavelmente mais atuante. Nos pacientes com infarto da parede anterior do VE, verificou uma maior ocorrência de hipotensão e taquicardia, sugerindo que a ação do sistema nervoso simpático era predominante.

Recentemente, o controle reflexo da circulação comandado pelos pressorreceptores tem sido reconhecido também como um importante preditor de risco após evento cardiovascular. 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 (IM), independente da fração de ejeção do VE e de arritmias ventriculares (La Rovere et al., 1998). Dessa forma, intervenções no sentido de melhorar a sensibilidade do barorreflexo e/ou a participação do sistema nervoso parassimpático cardíaco no controle da PA e da FC têm sido vistas como novas estratégias no manejo das doenças cardiovasculares.

Considerando o exposto e frente à maior incidência de IM em indivíduos diabéticos, bem como suas conseqüências adversas, faz-se necessário um estudo detalhado das respostas funcionais, moleculares e autonômicas de corações diabéticos submetidos à injúria isquêmica, bem como de suas influências na mortalidade.

### ***1.3. Diabetes e infarto do miocárdio***

Conforme comentado anteriormente, os indivíduos diabéticos apresentam aumento do risco de eventos cardiovasculares (Muir et al., 1992). Alterações na função e estrutura cardíacas em decorrência do diabetes podem levar ao desenvolvimento da cardiomiopatia diabética, contribuindo para a ocorrência de IM. Apesar de estudos demonstrarem maior morbidade e mortalidade pós-IM em pacientes diabéticos, outros trabalhos sugerem que o coração diabético seria menos susceptível à injúria isquêmica.

Neste sentido, Harjai et al. (2003) estudando pacientes acompanhados durante seis meses de internações após o IM, verificaram maior incidência de mortalidade em indivíduos diabéticos quando comparados com os não diabéticos (8,1 vs. 4,2%, respectivamente). Estes achados foram associados ao maior tamanho do IM nos pacientes diabéticos. Em um estudo realizado por Forrat et al. (1993), com cães diabéticos por STZ, foi aplicado um modelo de isquemia e reperfusão sendo demonstrado que para qualquer quantidade de fluxo colateral a extensão da necrose miocárdica era maior nos diabéticos, sugerindo, desta forma, que indivíduos diabéticos têm pior prognóstico pós IM.

Em contraste, outros dados semelhantes na literatura apontam para a idéia de uma maior tolerância à isquemia aguda nos animais diabéticos (Ravingerova et al., 2003). Tosaki et al. (1995) mostraram que o coração diabético foi mais resistente à isquemia e reperfusão após pouco tempo de exposição à hiperglicemia, não sendo visto o mesmo em ratos com longo tempo de diabetes por STZ. Posteriormente, tais achados foram confirmados por Xu et al. (2004) que utilizaram tempos de 4 e 20 semanas de

diabetes (STZ) para a indução da oclusão coronariana em ratos. Os autores observaram que os animais infartados com 4 semanas de diabetes tiveram uma área de infarto cerca de 20% menor, se comparados com os animais que foram ocluídos com 20 semanas de diabetes.

O prognóstico tem sido melhor em pacientes diabéticos com bom controle metabólico comparado com os pacientes com pobre controle metabólico. Todavia, a principal complicação cardíaca no DM, com ou sem IM, consiste na contratilidade diminuída do ventrículo esquerdo, aumento da incidência de distúrbios de condução atrioventricular e intraventricular, alterações funcionais essas, que podem contribuir para um pior prognóstico após o IM em diabéticos (Gray et al., 2002).

Em nosso laboratório foi detectado prejuízo na função ventricular “in vivo” e “in vitro” em ratos diabéticos, sendo esta revertida pelo treinamento físico aeróbico (De Angelis et al., 2000a; Wichi et al., 2005). Atualmente, a cardiomiopatia diabética é vista como resultado de complexas relações entre anormalidades metabólicas que acompanham o diabetes e suas conseqüências moleculares, levando a alteração da estrutura e função miocárdicas (Poornima et al., 2006). No DM há aumento na oxidação de ácidos graxos e acúmulo mitocondrial de acil carnitina, levando à piora da fosforilação oxidativa (Ding et al., 2006). O aumento dos ácidos graxos livres pode alterar diretamente a contratilidade miocárdica por meio de encurtamento do potencial de ação e alteração no trânsito intracelular de  $Ca^{2+}$ . No miócito, as enzimas que catalizam a glicólise são localizadas próximas ao sarcolema e ao RS. O ATP gerado pela glicólise é preferencialmente utilizado por proteínas transportadoras de íons, como a SERCA2 e o trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX). Assim, a inibição da glicólise cardíaca

decorrente do aumento da oxidação de ácidos graxos no diabetes, pode alterar o funcionamento dessas proteínas e, conseqüentemente, o trânsito de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Ding et al., 2006). De fato, estudos têm demonstrado redução da expressão e atividade da SERCA2 (Vasanji et al., 2004; Netticadan et al., 2001) e NCX (Chattou et al., 1999) em animais diabéticos por STZ, reduzindo o transiente de cálcio no miócito cardíaco com conseqüente aparecimento de disfunção sistólica e diastólica nestes animais.

Em síntese, os estudos experimentais mostram ambos: maior ou menor vulnerabilidade do coração diabético à injúria isquêmica. É possível que essa variação seja dependente, entre muitos fatores, do tempo de oclusão coronariana, visto que na literatura os dados mostram tempos reduzidos de ligadura da artéria coronária em animais com diferentes tempos de diabetes. Portanto, avaliações funcionais e estruturais (hemodinâmicas e moleculares) cardíacas durante o curso temporal do IM no diabetes por STZ seriam desejáveis, uma vez que poderiam contribuir para o entendimento dessas controvérsias. Além disso, poderiam também fornecer subsídios para intervenções terapêuticas diferenciadas, caso elas pudessem ser planejadas para ocorrerem nos períodos em que a função estivesse melhor preservada.

Nesse trabalho, testaremos a hipótese de que o coração diabético é menos sensível à isquemia miocárdica crônica utilizando a avaliação morfométrica e da função ventricular, bem como o acompanhamento da mortalidade. Além disso, buscaremos estudar os possíveis mecanismos envolvidos nas adaptações à injúria isquêmica avaliando as alterações da função autonômica cardiovascular e da expressão de proteínas relacionadas a homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.



## **2. OBJETIVOS**

### ***Geral***

Avaliar o efeito do infarto do miocárdio nas alterações ventriculares, funcionais e moleculares, cardio-respiratórias e autonômicas de ratos diabéticos por estreptozotocina.

### ***Específicos***

Avaliar os efeitos do infarto do miocárdio experimental em ratos diabéticos por estreptozotocina nos seguintes parâmetros:

- peso corporal e glicemia;
- pressão arterial e frequência cardíaca;
- consumo máximo de oxigênio (VO<sub>2</sub> máx.);
- área de infarto do ventrículo esquerdo pelo ecocardiograma;
- morfometria e função ventricular de forma não invasiva pelo ecocardiograma e de forma invasiva através da cateterização do ventrículo esquerdo;
- expressão das proteínas relacionadas à recaptção de Ca<sup>2+</sup> no miócito cardíaco;
- sensibilidade do barorreflexo;
- variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial.

### **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 (nº de protocolo: 151/04)

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 em ciclo de 12 horas (claro/escuro). Água e comida foram oferecidas de modo irrestrito, sendo a dieta normoprotéica. Os animais foram randomicamente divididos em 4 grupos a seguir relacionados.

**Grupo Controle (C)** – Os animais foram acompanhados durante 90 dias.

**Grupo Diabético (D)** - O diabetes foi induzido no início do protocolo (dia 1) e os animais foram acompanhados durante 90 dias.

**Grupo Infartado (I)** - Foi realizada a oclusão coronariana aos 14 dias de protocolo, sendo os animais acompanhados durante 90 dias.

**Grupo Diabético/ Infartado (DI)** – O diabetes foi induzido no dia 1 e no dia 14 foi realizada a oclusão coronariana, seguindo-se o acompanhamento dos animais até 90 dias.

Para o estudo da mortalidade iniciamos o protocolo com os seguintes números de animais por grupo: C (n=18), D (n=16), I (n=22) e DI (n=18). As demais avaliações foram realizadas em 8 animais por grupo.

### 3.2. Seqüência experimental

Os grupos experimentais seguiram a seqüência descrita no quadro abaixo:

<b>Dias / Procedimentos</b>	<b>1</b>	<b>14-16</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>A partir de 90</b>
<b>Indução do diabetes</b>	<b>X</b>					
<b>Infarto do Miocárdio</b>		<b>X</b>				
<b>Avaliação Ecocardiográfica</b>		<b>X</b>				<b>X</b>
<b>Avaliação da Glicemia</b>			<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>Avaliação do Consumo de Oxigênio</b>			<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>Avaliação Direta da Função Ventricular</b>						<b>X</b>
<b>Avaliações Hemodinâmicas Sistêmicas</b>						<b>X</b>
<b>Avaliação da Expressão de Proteínas Cardíacas (<i>Western Blot</i>)</b>						<b>X</b>

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

Após um 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 da cauda (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).

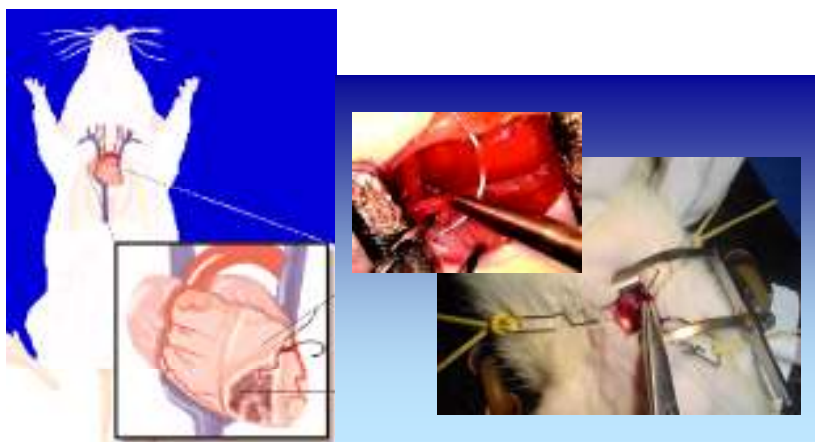
Cerca de 2 dias após a indução, os animais foram novamente submetidos a um jejum de 8 horas para verificar a ação da estreptozotocina. A dosagem da glicemia foi realizada por hemoglicoteste, através de tiras Advantage (Advantage - Roche®). Foram selecionados para os grupos diabéticos os animais que apresentaram glicemia acima de 250 mg/dL.

### ***3.4. Infarto do miocárdio***

O infarto do miocárdio (IM) experimental foi realizado quatorze dias após a indução do diabetes e/ou injeção de tampão citrato. Os animais foram pesados e anestesiados com uma mistura de Cetamina (80 mg/Kg) e Xilazina (12 mg/Kg) por via intra-peritoneal. Foram colocados em decúbito dorsal e entubados (Gelko-14G). Um pequeno corte foi realizado na pele e os músculos peitorais afastados. Os animais eram

submetidos à respiração artificial (Harvard Aparattus<sup>®</sup>, Boston, EUA) e realizada uma toracotomia esquerda no quarto espaço intercostal, sendo colocado um afastador entre as costelas para permitir a melhor visualização. O pericárdio foi seccionado e o átrio esquerdo afastado para visualização da artéria coronária esquerda. Esta foi ligada (fio mononylon 6.0) provocando a isquemia miocárdica.

Após a ligadura, a incisão torácica foi fechada (fio mononylon 5.0) e o pneumotórax retirado mediante a sucção do ar com uma agulha (5x7) conectada a uma seringa de 10ml. Logo após, os animais foram retirados da ventilação artificial e a respiração natural foi estimulada. Os músculos afastados para a cirurgia foram reposicionados e a pele foi suturada (fio mononylon 4.0). Os animais receberam 30000 UI de Benzilpenicilina Benzatina (Penretard, Cibran, Tanquá, RJ, Brasil, i.m.) e foram colocados em ambiente aquecido para recuperação (Pfeffer et al., 1979) (Figura 1).



**Figura 1.** Ilustração e foto do infarto do miocárdio experimental em ratos.

### ***3.5. Avaliações ecocardiográficas***

As avaliações ecocardiográficas foram realizadas nos grupos em torno do 14<sup>o</sup> ao 16<sup>o</sup> dia de protocolo, ou seja, 1 a 2 dias após a cirurgia de IM nos grupos infartados, sendo esta chamada de avaliação inicial. Os animais foram novamente avaliados aos 90 dias de protocolo, denominando-se esta de avaliação final.

Após a anestesia com uma solução intra-peritoneal de Cetamina (80 mg/kg) e Xilazina (12mg/kg), os animais tiveram a região torácica devidamente tricotomizada e foram mantidos em decúbito lateral para a realização do exame ecocardiográfico com aparelho SEQUOIA 512 (ACUSON, Corporation, Mountain View, CA-EUA). O transdutor utilizado foi linear e multifrequencial (10-14mHz), que permite imagens bidimensionais e monodimensionais simultâneas, além da análise de fluxo por efeito Doppler espectral. Foram realizados os registros eletrocardiográficos mediante a colocação de três eletrodos para a derivação DII. A profundidade de imagem trabalhada foi de 2cm.

Foram utilizadas as janelas longitudinais paraesternais direitas para a obtenção dos cortes longitudinal e transversal e as janelas longitudinais paraesternais esquerdas para a obtenção dos cortes apicais (duas, quatro e cinco câmaras). As medidas lineares foram realizadas nas imagens obtidas pelo modo-M, conforme descrito por Schiller et al. (1979), com as seguintes medidas: espessura diastólica do septo interventricular (SVDIA), cavidade do ventrículo esquerdo (VE) ao final da diástole (VEDIA) e espessura diastólica da parede posterior. A massa ventricular esquerda (MVE) foi então

obtida a partir da fórmula:  $1,047 \times [(SIVDIA+VEDIA+PPDIA)^3 - VEDIA^3]$  onde: 1,047 representam a densidade do miocárdio, validada em ratos por Fard et al. (2000). A MVE foi também corrigida pelo peso corporal (valor absoluto / peso corporal do animal). A função sistólica foi avaliada pela fração de ejeção (FE%), pelo método Simpson modificado por se mostrar mais fidedigno em corações infartados, também pela velocidade de encurtamento circunferencial (VEC-circ/seg), cujas fórmulas estão a seguir:

Simpson modificado :

$$V = \left(\frac{\pi}{4}\right) \sum_{i=1}^{20} a_i b_i \times \left(\frac{L}{20}\right)$$

onde L = comprimento do ventrículo esquerdo

dividido em 20 discos (i= 1 a i= 20) da base ao ápice, com o diâmetro de cada disco determinado em duas visões apicais (a e b). Com este procedimento feito tanto na diástole como na sístole, obtivemos os respectivos volumes (diastólico e sistólico), o qual permitiu o cálculo da fração de ejeção:  $FE = (\text{volume diastólico final} - \text{volume sistólico final} / \text{volume diastólico final}) \times 100\%$  . Desta maneira, também obtivemos as medidas do eixo do VE, assim como a área do mesmo. A velocidade de encurtamento circunferencial foi obtida pela seguinte fórmula:  $VEC = (VEDIA - VESIS) / (VEDIA \times TE)$ , 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 VE, 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. 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) a 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 (TDE) – 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.

Entretanto, além das avaliações da função sistólica e diastólica separadamente, utilizamos um outro método de avaliação funcional combinado, o índice de desempenho miocárdico (IDM), derivado de intervalos obtidos pelo Doppler pulsátil. Validado em camundongos por Broberg et al.(2003), o IDM é conceitualmente simples e representa a razão do tempo total gasto na atividade isovolumétrica (contração e relaxamento isovolumétricos) pelo tempo de ejeção. Para tanto, mede-se o tempo de relaxamento da válvula mitral (a), que corresponde à soma do tempo de contração isovolumétrica, tempo de ejeção e tempo de relaxamento isovolumétrico. O tempo de ejeção é obtido pela medida da duração do fluxo de via de saída do ventrículo esquerdo (b). Pela fórmula  $(a) - (b) / b$ , podemos então obter o IDM.



A região de infarto foi delimitada de acordo com a cinética das paredes do miocárdio, avaliadas pelas seguintes janelas ecocardiográficas: longitudinal paraesternal direita, transversal (ao nível dos músculos papilares) e apical (2 e 4 câmaras). Regiões hipocinéticas (espessamento sistólico abaixo do normal), acinéticas (ausência de espessamento durante a sístole) e discinéticas (movimentação paradoxal durante a sístole) foram consideradas como infartadas. Desta forma, a área de infarto foi delimitada através da razão destas regiões com a área total das paredes miocárdicas do VE. Moisés et al. (2000) e Nozawa et al.(2006), utilizando-se desta metodologia, demonstraram altíssima sensibilidade e especificidade para a delimitação da área de infarto do miocárdio em ratos, com 100% de confiabilidade quando comparada a estudos anátomo-patológicos. Todas as medidas seguiram as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia.

As variáveis ecocardiográficas analisadas nos grupos experimentais foram:

*Área de Infarto;*

Variáveis Morfométricas:

- *MVE*, Massa do VE (absoluta e corrigida);
- *VEDIA*, Cavidade do VE em diástole (absoluta e corrigida);
- *EMVE*, Eixo Maior do VE em diástole;
- *AVE*, Área do VE em Diástole;

Variáveis de Função Sistólica:

- *FE*, Fração de Ejeção;

- *VEC*, Velocidade de Encurtamento Circunferencial;

Variáveis de Função Diastólica:

- *TRIV*, Tempo de Relaxamento Isovolumétrico;
- *TDE*, Tempo de Desaceleração da Onda *E*;

Variável de Função Global:

- *IDM*, Índice de Desempenho Miocárdico.

### ***3.6. Teste de esforço máximo***

Para realização do teste de esforço máximo, os animais foram posicionados individualmente em uma caixa metabólica sobre a esteira rolante. O tempo de observação foi de aproximadamente trinta minutos, com o propósito de aclimatação do animal dentro da caixa metabólica. Imediatamente após a coleta do consumo de oxigênio de repouso o teste de esforço foi iniciado. O teste constitui em um protocolo de esforço escalonado e progressivo com incrementos de velocidade de 3m/min a cada 3 minutos, até que fosse atingida a velocidade máxima suportada pelos animais. O critério utilizado para a determinação da exaustão do animal e interrupção do teste foi o momento em que o rato não era mais capaz de correr dentro da caixa metabólica mediante o incremento de velocidade da esteira (Brooks & White, 1978; Rodrigues et al., 2007).

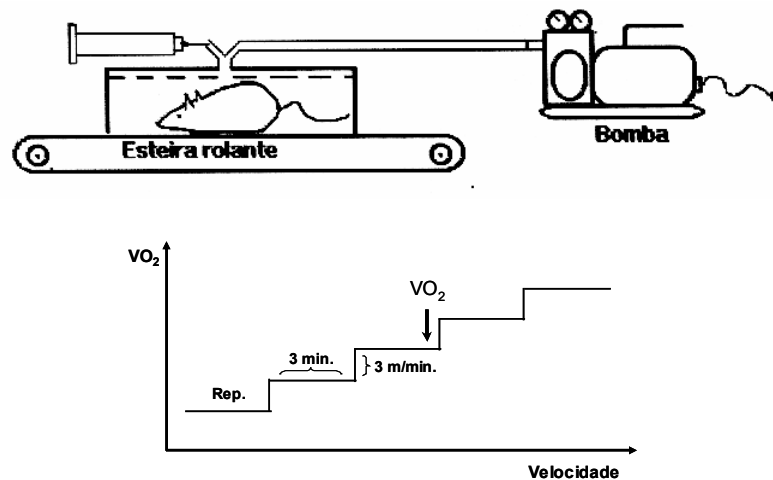
### ***3.7. Avaliação do consumo máximo de oxigênio (VO<sub>2</sub>máx.)***

Todos os animais foram submetidos à avaliação do consumo de oxigênio pelo método de respirometria aberta. A determinação metabólica de consumo de oxigênio foi de acordo com o método descrito por Brooks & White, (1978).

O consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub>) foi avaliado por meio de uma caixa metabólica conectada a um sensor de oxigênio (Ametek N-22M-S-3<sup>A</sup>/I) que analisa, continuamente, as amostras das frações expiradas de oxigênio (FeO<sub>2</sub>), bem como os valores das concentrações ambientais de oxigênio (FiO<sub>2</sub>) (Figura 2) (Rodrigues et al., 2007). Posteriormente os valores de VO<sub>2</sub> de cada animal foram calculados pela seguinte fórmula matemática:

$$\text{VO}_2 \text{ (mlO}_2\text{/ kg}^{-1}\text{/ min}^{-1}\text{)} = \text{VE (FiO}_2\text{ - FeO}_2\text{) / PC,}$$

onde: VE = Fluxo da bomba de sucção (ml/min); FiO<sub>2</sub> = Fração inspirada de O<sub>2</sub>; FeO<sub>2</sub> = Fração expirada de O<sub>2</sub>; PC = Peso corporal do animal (g). O VO<sub>2</sub> máx. foi definido como sendo o ponto que não havia mais aumento de VO<sub>2</sub> (± 5%) após incrementos progressivos na velocidade.



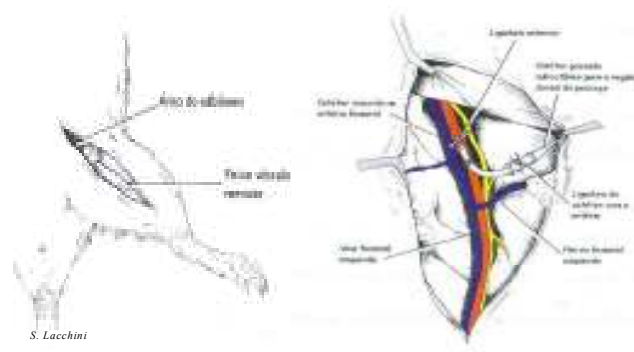
**Figura 2.** Esquema demonstrativo da realização da medida do consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2\text{máx.}}$ ) concomitante ao teste de esforço máximo em ratos.

### ***3.8. Avaliações hemodinâmicas sistêmicas***

#### ***3.8.1. Canulação***

Após os 90 dias de protocolo, os animais foram anestesiados com uma solução de Cetamina (80mg/Kg) e Xilazina (12mg/Kg), através de injeção intra-peritoneal. Logo após realizou-se a incisão na região inguinal e a inserção dos cateteres de tygon P10 no interior da veia e artéria femural para registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) (Figura 3). As cânulas foram fixadas com fio de algodão na artéria e na veia, suas extremidades mais calibrosas foram passadas subcutaneamente e exteriorizadas no dorso da região cervical, sendo fixadas com fio de algodão na pele.

Cada rato foi mantido em uma caixa (Plexiglas, 25x15x10cm) durante a realização das avaliações hemodinâmicas sistêmicas no dia seguinte (1 dia) ao procedimento cirúrgico.



**Figura 3.** Desenho da canulação da artéria e veia femoral em posição anátomo-cirúrgica.

### 3.8.2. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

No dia seguinte à canulação, com o animal acordado, a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal pela caixa durante todo o período do experimento. Esta extensão foi conectada a um transdutor de pressão (Blood Pressure XDCR, Kent<sup>©</sup> Scientific, Litchfield, CT, EUA) que, por sua vez, estava conectada a um pré-amplificador (Stemtech BPMT-2, Quintron Instrument<sup>©</sup> Inc, Milwaukee, EUA). Sinais de PA foram gravados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (CODAS, DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA), permitindo análise dos pulsos

de pressão, batimento a batimento, com uma frequência de amostragem de 2000 Hz por canal (Figura 4).

A análise foi feita utilizando-se um programa comercial associado ao sistema de aquisição. Este programa permitiu a detecção de pontos 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) pelo intervalo de pulso, foi determinada a partir do intervalo entre dois picos sistólicos. Os resultados foram apresentados em valores médios e erros padrões dos períodos em que os dados foram analisados para PA e FC. As planilhas de dados obtidas foram analisadas em programa comercial para análise (Excel 6.0), onde se calcularam a média e desvio padrão de PA média, PAS, PAD e FC para cada animal.



**Figura 4.** Sistema de registro da pressão arterial e frequência cardíaca

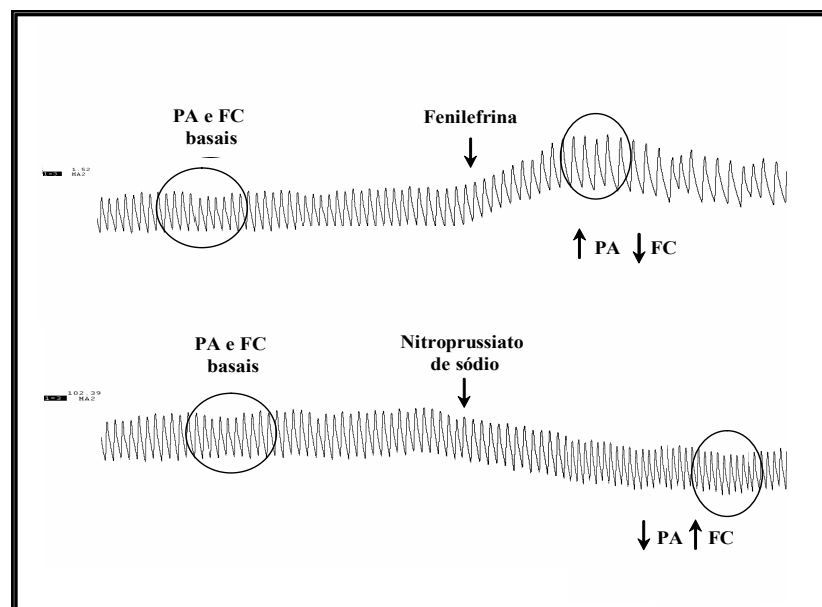
### ***3.9. Avaliação da sensibilidade barorreflexa***

Após o registro da pressão arterial e da frequência cardíaca, os animais permaneceram em repouso por 15 minutos e uma extensão de aproximadamente 20cm (P10) foi conectada na cânula venosa para posterior injeção de drogas vasoativas. A sensibilidade dos pressorreceptores foi testada através da infusão em “bolus” (0,1 ml) de fenilefrina e logo após nitroprussiato de sódio, sempre nesta seqüência (Figura 5).

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 usada para provocar aumento da pressão arterial. Esse aumento da pressão arterial é seguido de bradicardia reflexa comandada pelos pressorreceptores.

O Nitroprussiato de Sódio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), um potente vasodilatador tanto de arteríolas como de veias e cuja ação se dá por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3', 5'- guanosina monofosfato (GMP cíclico) na musculatura lisa de vasos e outros tecidos, foi usado para provocar queda da pressão arterial. Essa queda é seguida por uma resposta de taquicardia reflexa comandada pelos pressorreceptores. As diluições de Fenilefrina e Nitroprussiato de Sódio variaram de 0,25 a 32  $\mu\text{g/mL}$ , buscando alterações de pressão arterial de até 30 mmHg. As diferentes concentrações das drogas foram preparadas em solução salina e mantidas em cuba com gelo, cobertas com papel laminado, até o momento do experimento.

O índice da sensibilidade do reflexo pressorreceptor foi calculado para cada variação de frequência cardíaca obtida para cada variação de pressão arterial e correlacionou a diferença de frequência cardíaca para cada variação de PA em mmHg ( $\Delta FC / \Delta PAM$ , bpm por mmHg). Foram obtidos para cada animal índices distintos, um correlacionando as quedas de FC com os aumentos de PA (índice de bradicardia reflexa, IBR) e outro correlacionando os aumentos de FC para cada mmHg de diminuição de PA (índice de taquicardia reflexa, ITR), expresso por bpm/mmHg.



**Figura 5.** Registro demonstrativo da pressão arterial e frequência cardíaca antes e após a administração de drogas vasoativas.



### ***3.10. Avaliações diretas (invasivas) da função ventricular esquerda***

#### ***3.10.1 Canulação do ventrículo esquerdo***

Após 1 dia da realização das avaliações hemodinâmicas sistêmicas, os animais foram anestesiados com Pentobarbital Sódico (40 mg/kg, ip) e um cateter de tygon P50 preenchido de salina foi utilizado para a canulação da veia jugular para a realização da sobrecarga de volume. Um segundo cateter de polietileno (P50) foi utilizado para a canulação do ventrículo esquerdo via artéria carótida direita. O cateter foi inserido até o ventrículo e sua posição determinada pela observação da característica onda de pressão ventricular.

#### ***3.10.2. Registro da pressão ventricular***

Antes da colocação do cateter P50 no ventrículo, a pressão arterial na carótida foi registrada durante 5 minutos através da conexão da cânula arterial a um transdutor de pressão (Blood Pressure XDCR, Kent<sup>©</sup> Scientific, Litchfield, CT, EUA) que, por sua vez, estava conectado a um pré-amplificador (STEMTECH BPMT-2, Quintron Instrument<sup>©</sup> Inc, Milwaukee, EUA). Os sinais de pressão arterial foram gravados em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (CODAS, DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA), permitindo análise dos pulsos de pressão tanto arterial quanto ventricular, batimento a batimento, com uma frequência de amostragem de 2000

Hz por canal. Em seguida, após a colocação da cânula no VE e uma espera de 5 minutos para estabilização, foram registrados 5 minutos de pressão ventricular esquerda para estudo dos valores de máxima pressão sistólica ventricular (PSVE), pressão diastólica final (PDF) e derivadas de contração (+dP/dt) e relaxamento (-dP/dt) do ventrículo esquerdo. A PDF foi determinada pela detecção manual do ponto de inflexão no traçado da onda de pressão diastólica do ventrículo esquerdo. Foram realizadas no mínimo 20 detecções por registro.

Após o registro basal os animais foram submetidos a uma sobrecarga de volume (0,8 ml de salina / 300 gramas de peso corporal) durante três minutos, sendo avaliados os parâmetros ventriculares acima citados no minuto 3 da sobrecarga de volume e da recuperação pós-sobrecarga de volume (Wichi et al., 2007). A sobrecarga de volume foi realizada com o intuito de investigar as diferenças de comportamento miocárdico nos grupos estudados sob uma situação de estresse cardiovascular.

### ***3.11. Expressão de proteínas cardíacas***

A expressão de proteínas envolvidas na recaptção de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático:  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2), fosfolambam (PLN), fosfolambam fosforilado na serina 16 (fosfo-Ser<sup>16</sup>-PLN), fosfolambam fosforilado na treonina 17 (fosfo-Tre<sup>17</sup>-PLN); na defosforilação de diferentes proteínas: proteína fosfatase 1 (PP1) e do trocador  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  (NCX, proteína responsável pela extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  da célula) foram analisadas nos homogeneizados de ventrículo

esquerdo dos animais estudados por meio da técnica de eletroforese de proteínas (Western blot).

### 3.11.1. Preparação dos homogeneizados ventriculares

Os ventrículos dos animais foram homogeneizados, utilizando-se um homogeneizador Polytron (PT-K Brinkman Instruments), em uma solução de tampão de lise hipotônico contendo tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), sacarose 0,3 M, DTT 0,5 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0), PMSF 0,3 mM, NaF 10 mM e coquetel de inibidor de fosfatase (1:100; Sigma-Aldrich-EUA). O processo de homogeneização foi realizado três vezes durante dez segundos com intervalos de vinte segundos entre as homogeneizações. Todo o processo foi realizado a 4°C. Os homogeneizados foram centrifugados a 12.000 rpm por vinte minutos a 4°C. O sobrenadante foi então transferido para tubos de 1,5 mL. A concentração de proteína das amostras foi analisada por meio do método de Bradford (Biorad-EUA). Aliquotas dos homogeneizados foram armazenadas em freezer -80°C até serem utilizadas (Rolim et al., 2007; Medeiros et al., 2007).

### 3.11.2. Western blot

Os homogeneizados ventriculares foram solubilizados a uma concentração final de 1% de SDS (sodium- dodecyl- sulfate) e em seguida as proteínas presentes nas amostras foram separadas eletroforéticamente em gel de SDS – poliacrilamida (6 e 10%, dependendo do peso molecular da proteína a ser estudada). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência contendo Tris (25 mM), glicina (192 mM), metanol (20%) e SDS (0,1%). As membranas foram lavadas duas vezes com solução tampão (TBS: Tris 10mM, pH 7,6 e NaCl 150 mM). Em seguida, o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado por meio de uma mistura contendo TBS com o detergente Tween 20 (0,1%) e leite desnatado (5%) por 120 minutos em temperatura ambiente (20-25°C) com agitação constante. A membrana, então, foi incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora (TBS e albumina 3%) a 4°C por 12 horas com agitação constante. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução de TBS-T. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário em solução bloqueadora (TBS-T e leite desnatado 1%) por uma hora e meia em temperatura ambiente com agitação constante. Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução de TBS-T para remover o excesso de anticorpo. Por fim, a imuno-deteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA).

Como anticorpos primários foram utilizados:

- SERCA2, camundongo IgG1 (Affinity BioReagents, CO-EUA): A titulação utilizada foi de 1:2500.
- Fosfolambam, camundongo IgG2a (Affinity BioReagents, CO-EUA): A titulação utilizada foi de 1:500.
- Fosfo-fosfolambam (serina 16), coelho IgG (RDI Incorporation, NJ-EUA): A titulação utilizada foi de 1:5000.
- Fosfo-fosfolambam (treonina 17), coelho IgG (Badrilla, Leeds-UK): A titulação utilizada foi de 1:5000.
- Trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , camundongo IgM (Affinity BioReagents, CO-EUA): A titulação utilizada foi de 1:2000.
- Proteína fosfatase 1, coelho IgG (Upstate, Lake Placid-NY): A titulação utilizada foi de 1:1000.

Como anticorpos secundários foram utilizados anticorpos conjugados a peroxidase (IgG anti-camundongo ou anti-coelho, ECL, Amersham Biosciences, NJ-EUA) anti os anticorpos primários, utilizados na titulação de 1:10000.

### ***3.12. Variabilidade no domínio do tempo e da frequência (análise espectral modelamento auto-regressivo).***

As variabilidades da frequência cardíaca (VFC) e da pressão arterial sistólica (VPAS) no domínio do tempo foram calculadas pela média dos desvios padrões de cada animal (SDNN) e pela variância total.

Cada batimento cardíaco foi identificado através da utilização de algoritmo implementado no programa Windaq/DATAQ que, automaticamente, realizou a detecção dos intervalos de pulso do evento sistólico da onda do sinal de pressão arterial. Após esta leitura automática foi realizada uma verificação por inspeção visual, com o intuito de identificar e/ou corrigir alguma marcação não correta. Em seguida, foi gerada a série temporal de cada sinal a ser estudado, isto é, o intervalo de pulso cardíaco (tacograma) e da pressão arterial sistólica (sistograma). Quando necessário, utilizávamos a interpolação linear da série tacograma e sistograma, para retirarmos as distorções indesejáveis. Os dados foram armazenados em arquivos em formato texto e utilizados, posteriormente, em um programa de análise espectral auto-regressiva linear (24 horas), o qual detectou a frequência central, número e potência de cada componente (Pagani et al., 1986; Pagani et al., 1997). A faixa de frequência de interesse para análise espectral no rato encontra-se no intervalo que vai de 0 até 3Hz. Os componentes de alta frequência (HF) encontram-se na faixa de 0,75 e 3,0 Hz (modulação vagal), os de baixa frequência (LF) na faixa de 0,20 e 0,75 Hz (modulação simpática) e muito baixa frequência (VLF) menores que 0,20 Hz. Este estudo não aborda as faixas de muito baixas frequências (VLF) por não estarem muito bem definidas pela literatura (Task Force, 1996).

### ***3.13. Análise estatística***

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O teste de análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, de uma ou duas vias,

seguido de testes complementares de *Student Newmann Keuls* foram devidamente aplicados para análise dos dados. A curva de sobrevida foi estimada pelo método de *Kaplan-Meier* e comparada entre os grupos pelo teste *log-rank*. A correlação de *Pearson* foi usada para estudar as associações entre as variáveis. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## **4. RESULTADOS**

### ***4.1. Avaliações metabólicas***

#### ***4.1.1. Peso corporal***

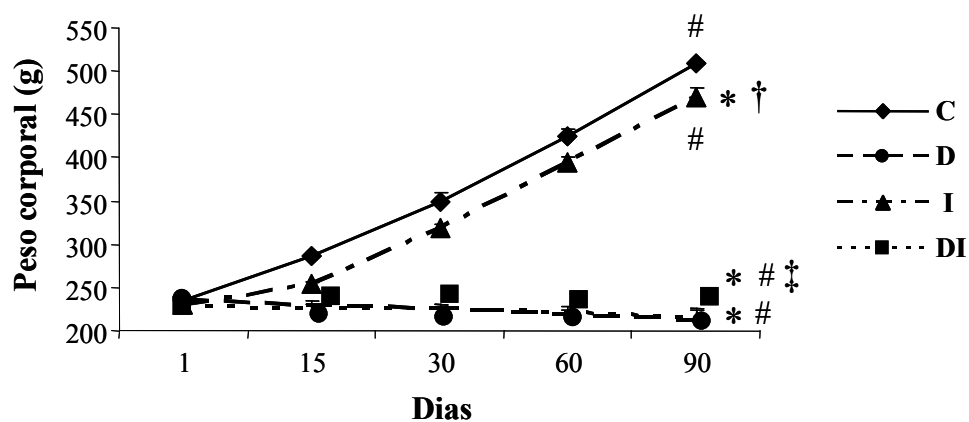
No início do protocolo (dia 1) o peso corporal foi semelhante entre grupos estudados. Os animais diabéticos (D e DI) reduziram o peso corporal durante o estudo em relação aos animais normoglicêmicos (C e I) e também se comparados com seus pesos corporais iniciais. Os grupos controle (C) e infartado (I) apresentaram aumento do peso corporal ao final do protocolo (90 dias) quando comparados aos seus pesos corporais iniciais. Porém, aos 90 dias, o grupo I apresentou menor peso corporal em relação ao grupo C (Tabela 1 e Figura 6).



**Tabela 1.** Peso corporal (gramas) no início (dia 1) e ao final do protocolo experimental (90 dias) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).

Peso Corporal / Grupos	C	D	I	DI
<b>Inicial (1 dia)</b>	234±3	237±4	231±2	229±4
<b>Final (90 dias)</b>	508±3#	213±10*#	471±9*†#	211±10*‡#

Valores representam média ± EPM. \* p<0,05 vs. C; † p<0,05 vs. D; ‡ p<0,05 vs. I; # p<0,05 vs. peso corporal inicial. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.



**Figura 6.** Peso corporal (gramas) do início (dia 1) até o final (90 dias) do protocolo experimental nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). \* p<0,05 vs. C em todos os tempos; † p<0,05 vs. D em todos os tempos; ‡ p<0,05 vs. I em todos os tempos; # p<0,05 vs. peso corporal inicial. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

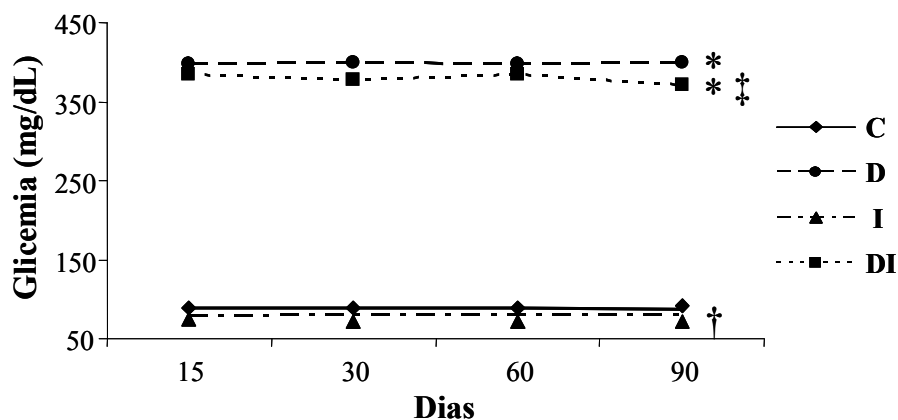
#### 4.1.2. Glicemia

Analisando a eficácia da indução do diabetes por STZ, nota-se que os grupos D e DI apresentaram hiperglicemia em relação aos grupos C e I durante todo protocolo experimental (Figura 7). Na Tabela 2 são apresentados os valores de glicemia (mg/dL) para os grupos estudados aos 15 e aos 90 dias após a injeção de STZ ou tampão citrato.

**Tabela 2.** Glicemia (mg/dL) aos 15 e aos 90 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).

<b>Glicemia/ Grupos</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>I</b>	<b>DI</b>
<b>15 dias</b>	88±4	398±25*	79±6†	384±42*‡
<b>90 dias</b>	89±3	400±27*	81±6†	371±37*‡

Valores representam média ± EPM. \* p<0,05 vs. C; † p<0,05 vs. D; ‡ p<0,05 vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.



**Figura 7.** Glicemia (mg/dL) avaliada aos 15, 30, 60 e 90 dias de protocolo nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). \*  $p < 0,05$  vs. C em todas as avaliações; †  $p < 0,05$  vs. D em todas as avaliações; ‡  $p < 0,05$  vs. I em todas as avaliações. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

## 4.2. Avaliações cardio-respiratórias

### 4.2.1. Pressão arterial e frequência cardíaca

Na Tabela 3 são apresentados os valores médios de pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM) (mmHg) e frequência cardíaca (FC) (bpm) dos quatro grupos experimentais estudados.

Os animais dos grupos D, I e DI apresentaram redução da PAS quando comparados ao grupo C, sendo que o grupo I apresentou maior PAS em relação ao grupo

D. Como característica do modelo de diabetes por STZ, observou-se uma redução da PAS, PAD, PAM e FC nos grupos D e DI quando comparados ao grupo C (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores de pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM) e frequência cardíaca (FC) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).

Grupos/ Variáveis	C	D	I	DI
<b>PAS (mmHg)</b>	129±2	109±3*	117±3*†	106±2*‡
<b>PAD (mmHg)</b>	92±2	83±2*	90±3	87±2*
<b>PAM (mmHg)</b>	111±2	96±3*	104±3	99±2*
<b>FC (bpm)</b>	352±12	302±7*	342±6	307±19*

Valores representam média ± EPM. \* p<0,05 vs. C; † p<0,05 vs. D; ‡ p<0,05 vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

#### 4.2.2. Consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$ máx.)

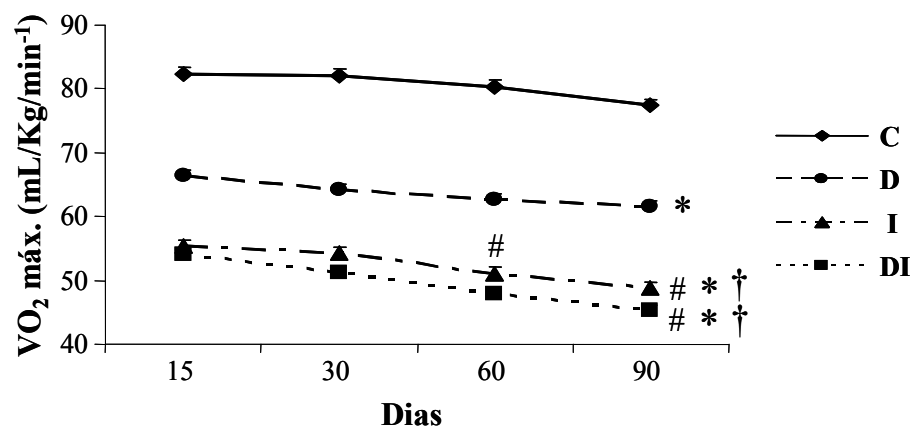
Na Tabela 4 são apresentados os valores de consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$  máx.) ( $ml/Kg/min^{-1}$ ) nos grupos estudados aos 15 e 90 dias após o IM. Analisando o  $VO_2$  máx., observou-se que os animais dos grupos D, I e DI apresentaram redução desta variável em relação aos animais do grupo C, aos 15, 30, 60 e 90 dias. Além disso, notou-se um prejuízo adicional dos grupos infartados (I e DI) em relação ao grupo D nas mesmas avaliações (Tabela 4 e Figura 8).

Em relação às comparações intra-grupos, observou-se que os animais do grupo I apresentaram redução do VO<sub>2</sub> máx. aos 60 e 90 dias de protocolo quando comparados com sua avaliação aos 15 dias. No entanto, o grupo DI apresentou esta diferença somente aos 90 dias, em comparação à sua avaliação aos 15 dias de protocolo (Tabela 4 e Figura 8).

**Tabela 4.** Consumo máximo de oxigênio (VO<sub>2</sub> máx.) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI) avaliados aos 15 e aos 90 dias.

<b>VO<sub>2</sub> máx.</b> <b>(ml/Kg/min<sup>-1</sup>)/</b> <b>Grupos</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>I</b>	<b>DI</b>
<b>15 dias</b>	82±3	66±2*	55±1*†	54±1*†
<b>90 dias</b>	77±3	62±1*	49±1*†#	45 ± 2*†#

Valores representam média ± EPM. \* p<0,05 vs. C; † p<0,05 vs. D; # p<0,05 vs. avaliação aos 15 dias. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.



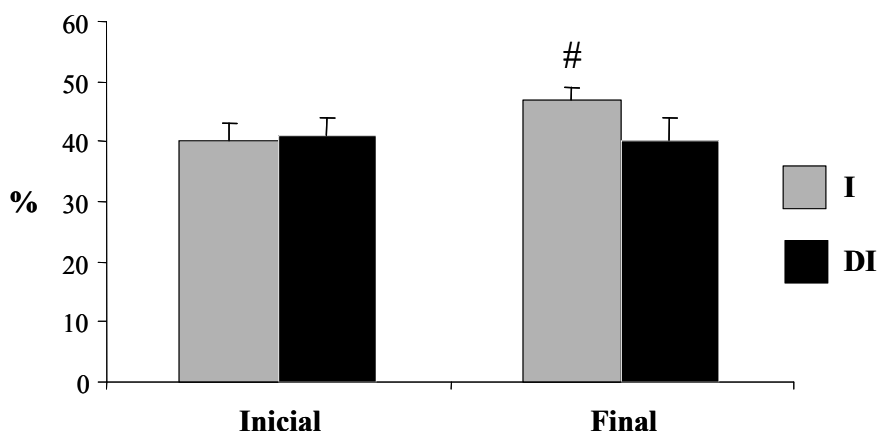
**Figura 8.** Consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$  máx.) ( $ml/Kg/min^{-1}$ ) avaliado aos 15, 30, 60 e 90 dias de protocolo, nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). \*  $p < 0,05$  vs. C em todas as avaliações; †  $p < 0,05$  vs. D em todas as avaliações; #  $p < 0,05$  vs. avaliação aos 15 dias. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

### 4.3. Avaliações ventriculares

#### 4.3.1. Avaliação ecocardiográfica da área de infarto do miocárdio

A área de IM, avaliada pelas áreas acinéticas e discinéticas do VE, foi semelhante entre os grupos I e DI na avaliação ecocardiográfica inicial (1 a 2 dias após o IM). Porém, o percentual de infarto da parede do VE na avaliação final dos animais I ( $51 \pm 1\%$ ) foi maior quando comparada à sua avaliação inicial ( $39 \pm 3\%$ ), enquanto que

nos animais DI não foi observada esta diferença (inicial:  $41\pm 3\%$  e final:  $40\pm 4\%$ ) (Figura 9).



**Figura 9.** Área de infarto representada pelo % de parede do ventrículo esquerdo acinético ou discinético, nos animais dos grupos infartado (I) e diabético/infartado (DI), em suas avaliações inicial (1 a 2 dias após o IM) e final (90 dias). #  $p < 0,05$  vs. avaliação inicial. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

#### 4.3.2. Avaliação ecocardiográfica da morfometria cardíaca

A Tabela 5 apresenta os valores da massa do ventrículo esquerdo (MVE, absoluto e corrigido) e a cavidade do VE em diástole (VEDIA) nos animais dos grupos C, D, I e DI. Os animais foram avaliados 1 a 2 dias após o IM (inicial) e aos 90 dias de protocolo (final). Não foram observadas diferenças entre os grupos C e D com relação às variáveis morfométricas avaliadas. A MVE foi semelhante entre os grupos estudados na avaliação inicial. Entretanto, na avaliação final, os animais do grupo I apresentaram aumento da massa do VE (corrigido e absoluto) quando comparados à sua avaliação

inicial (Tabela 5). Além disto, a MVE (absoluta) foi maior no grupo DI em relação ao grupo C na avaliação final. Quando avaliada a VEDIA, observou-se que os animais dos grupos infartados (I e DI) apresentaram aumento nessa variável, nas avaliações inicial e final em relação aos grupos não infartados (C e D) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Massa do ventrículo esquerdo (MVE, absoluta e corrigida) e cavidade do ventrículo esquerdo em diástole (VEDIA), nos animais controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI), nas avaliações inicial (1 a 2 dias após o IM) e final (90 dias).

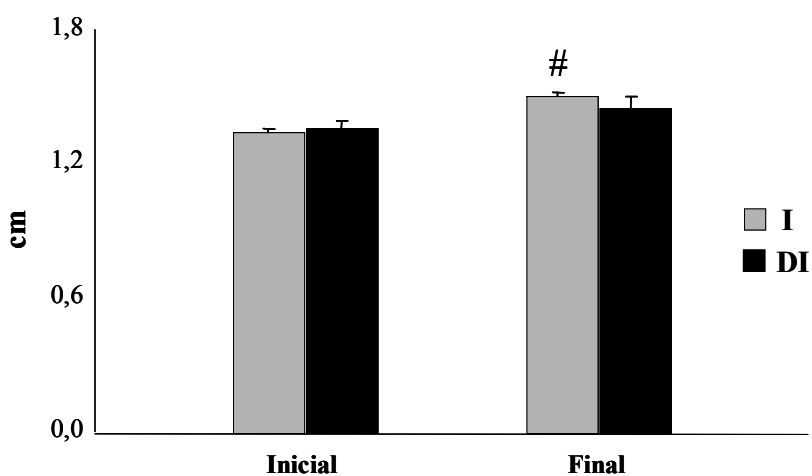
Grupos/ Variáveis		C	D	I	DI
MVE (g)	Inicial	0,53±0,02	0,44±0,02	0,57±0,05	0,54±0,02
	Final	0,64±0,04	0,44±0,03	0,72±0,05#	0,70±0,07#
MVE corr. (g/Kg)	Inicial	1,02±0,02	0,95±0,01	1,05±0,04	1,04±0,002
	Final	1,11±0,03	0,95±0,02	1,18±0,04#	1,16±0,06
VEDIA (cm)	Inicial	0,65±0,01	0,63±0,01	0,75±0,01*†	0,77±0,03*†
	Final	0,71±0,02	0,71±0,04	0,85±0,02*†	0,86±0,03*†

Valores representam média ± EPM. \* p<0,05 vs. C; † p<0,05 vs. D; # p<0,05 vs. avaliação inicial. Massa do ventrículo esquerdo absoluto (MVE, g) e corrigido pelo peso corporal (MVE corr., g/Kg); cavidade do ventrículo esquerdo em diástole (VEDIA, cm). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

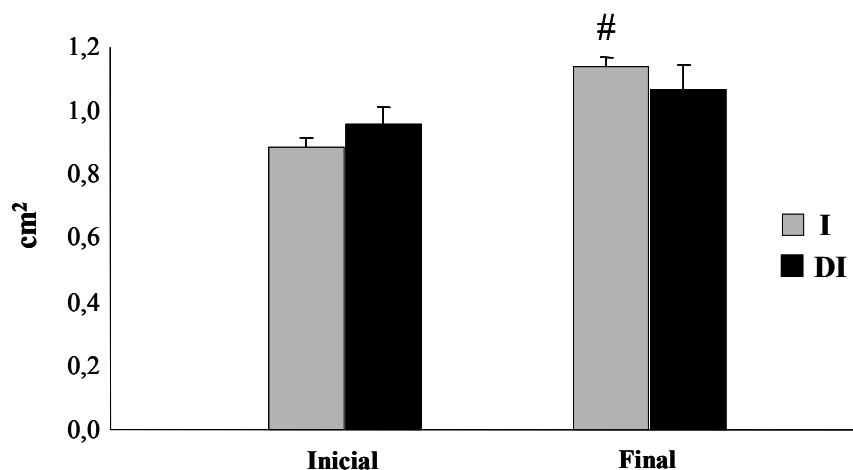
Foram avaliadas variáveis morfométricas adicionais nos grupos infartados (I e DI), sendo estas: eixo maior do VE em diástole (cm) e área do VE em diástole (cm<sup>2</sup>). O



eixo maior (EMVE) e a área do VE (AVE), ambos em diástole, foram maiores na avaliação final ( $1,5 \pm 0,02$  cm e  $1,1 \pm 0,03$  cm<sup>2</sup>, respectivamente) quando comparados à avaliação inicial ( $1,3 \pm 0,02$  cm e  $0,9 \pm 0,03$  cm<sup>2</sup>, respectivamente) nos animais do grupo I. No entanto, não foram observadas diferenças significantes entre os animais DI para os mesmos parâmetros estudados, entre a avaliação final (EMVE:  $1,4 \pm 0,05$  cm e AVE:  $1,0 \pm 0,07$  cm<sup>2</sup>) e inicial (EMVE:  $1,4 \pm 0,03$  cm e AVE:  $0,9 \pm 0,05$  cm<sup>2</sup>) (Figuras 10 e 11).



**Figura 10.** Eixo maior do ventrículo esquerdo (EMVE, cm) nos grupos infartado (I) e diabético/infartado (DI), nas avaliações inicial e final. #  $p < 0,05$  vs. avaliação inicial. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.



**Figura 11.** Área do ventrículo esquerdo em diástole (AVE,  $\text{cm}^2$ ) nos grupos infartado (I) e diabético/infartado (DI), nas avaliações inicial e final. #  $p < 0,05$  vs. avaliação inicial. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

#### 4.3.3. Avaliação ecocardiográfica da função sistólica

Na Tabela 6 são apresentados os parâmetros de função sistólica: fração de ejeção (FE, em %) e velocidade de encurtamento circunferencial (VEC, em  $\text{circ}/\text{seg } 10^{-4}$ ) nas avaliações inicial (1 ou 2 dias após o IM) e final (90 dias) dos grupos C, D, I e DI. Foram observados menores valores de FE na avaliação final do grupo D em relação à avaliação inicial. Houve uma redução da FE nos grupos infartados (I e DI) quando comparados com o grupo C nas avaliações inicial e final. Além disto, a FE apresentou-se reduzida nos grupos I e DI em comparação ao grupo D na avaliação inicial. Vale ressaltar que, na avaliação final, os animais do grupo DI apresentaram reduzida FE em

relação ao grupo C, porém tiveram maior FE quando comparados com os animais do grupo I (Figura 12 e Tabela 6).

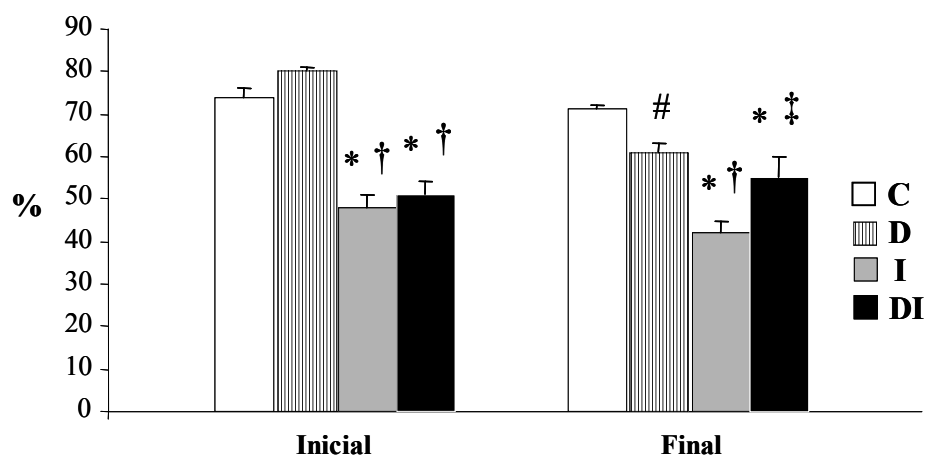
A VEC foi menor nos animais do grupo D quando comparada aos animais do grupo C na avaliação final e também em relação à sua avaliação inicial. Redução da VEC também foi observada nos grupos I (avaliações inicial e final) e DI (avaliação inicial) em comparação ao grupo C. Quando comparamos as avaliações finais dos animais infartados (I e DI), notou-se que a VEC estava aumentada nos animais do grupo DI em relação aos animais do grupo I (Tabela 6).

Dessa forma, tanto pela FE, quando pela VEC, observou-se um menor comprometimento da função sistólica no grupo DI em relação ao grupo somente infartado (I).

**Tabela 6.** Fração de ejeção (FE) e velocidade de encurtamento circunferencial (VEC) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético infartado (DI).

Grupos/ Variáveis		C	D	I	DI
FE (%)	Inicial	74±2	80±1	48±3*†	51±3*†
	Final	71±1	61±2#	42±3*†	55±5*‡
VEC (circ/seg 10 <sup>-4</sup> )	Inicial	56±3	54±2	38±2*	38±3*
	Final	50±3	38±4#*	34±2*	43±1‡

Valores representam média ± EPM. \* p<0,05 vs. C; † p<0,05 vs. D; ‡ p<0,05 vs. I; # p<0,05 vs. avaliação inicial (1 a 2 dias após o IM). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.



**Figura 12.** Fração de ejeção (FE, %) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI), nas avaliações inicial e final. \* p<0,05 vs. C; † p<0,05 vs. D; ‡ p<0,05 vs. I; # p<0,05 vs. avaliação inicial (1 a 2 dias). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

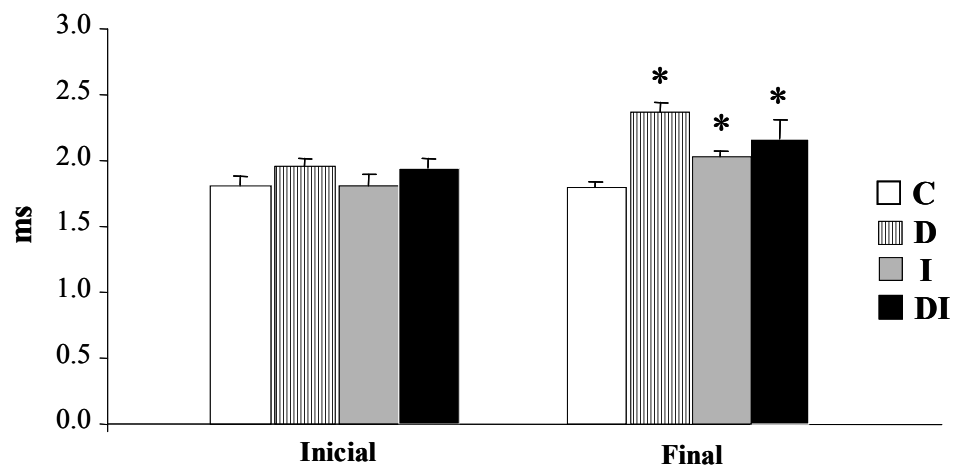
#### 4.3.4. Avaliação ecocardiográfica da função diastólica

Na Tabela 7 são apresentados os parâmetros de função diastólica: tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV, ms) e tempo de desaceleração da onda E (TDE, ms) nos grupos estudados, tanto no início (1 a 2 dias após o IM) quanto no final do protocolo (90 dias). Não foram observadas alterações significativas no TRIV (Figura 13) e TDE entre os grupos na avaliação inicial. No entanto, aos 90 dias (avaliação final) notou-se aumento em ambos os índices de função diastólica nos animais dos grupos D, I e DI, quando comparados aos controles (Tabela 7).

**Tabela 7.** Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e tempo de desaceleração da onda E (TDE) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético infartado (DI).

Grupos/ Variáveis		C	D	I	DI
TRIV (ms)	Inicial	1,81±0,07	1,96±0,05	1,81±0,09	1,94±0,08
	Final	1,79±0,05	2,37±0,07*	2,03±0,05*	2,16±0,15*
TDE (ms)	Inicial	1,87±0,1	1,95±0,1	1,97±0,1	1,83±0,09
	Final	1,75±0,07	2,38±0,09*	2,13±0,09*	2,45±0,25*

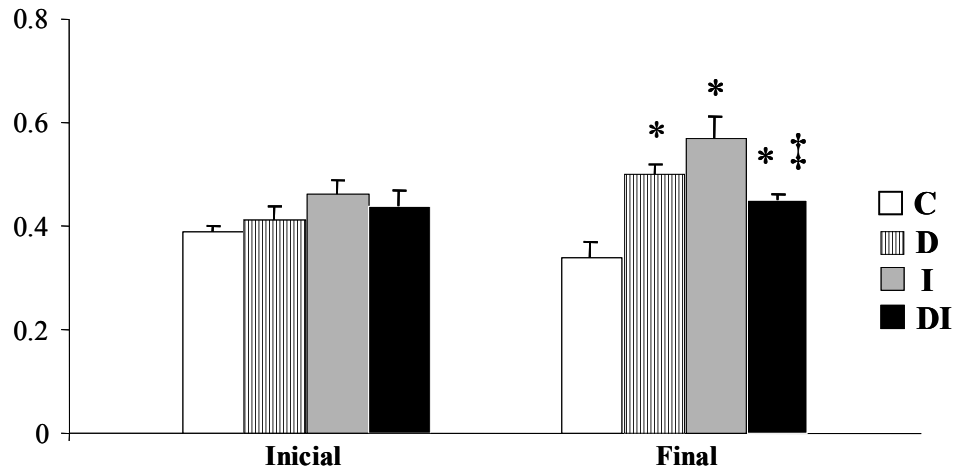
Valores representam média ± EPM. \* p<0,05 vs. C. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.



**Figura 13.** Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV, ms) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI), nas avaliações inicial e final. \*  $p < 0,05$  vs. C. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

#### 4.3.5. Avaliação ecocardiográfica da função global

A avaliação da função global dos grupos experimentais foi realizada através do índice de desempenho miocárdico (IDM), um índice que representa o esforço miocárdico realizado para manter a perfusão tecidual adequada. O IDM foi semelhante nos grupos C ( $0,39 \pm 0,01$ ), D ( $0,41 \pm 0,03$ ), I ( $0,46 \pm 0,03$ ) e DI ( $0,44 \pm 0,03$ ) na avaliação inicial. Porém, na avaliação final, os animais dos grupos D ( $0,50 \pm 0,02$ ), I ( $0,57 \pm 0,04$ ) e DI ( $0,45 \pm 0,01$ ) apresentaram aumento significativo do IDM quando comparados aos animais do grupo C ( $0,34 \pm 0,03$ ). Adicionalmente, observou-se reduzido IDM no grupo DI em relação ao grupo I, demonstrando um aumento do esforço miocárdico no grupo I quando comparado ao grupo DI (Figura 14).



**Figura 14.** Índice de desempenho miocárdico (IDM, em UA) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI), nas avaliações inicial e final. \*  $p < 0,05$  vs. C; ‡  $p < 0,05$  vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

#### 4.3.6. Avaliação direta (invasiva) da função ventricular

Os valores de pressão sistólica (PSVE), diastólica final (PDF) e da frequência cardíaca (FC) ventriculares, bem como as derivadas de contração (+dP/dt) e relaxamento (-dP/dt) do VE no período basal, terceiro minuto da sobrecarga de volume e na recuperação deste procedimento, são apresentados na Tabela 8. A sobrecarga de volume foi realizada com o intuito de testar a adaptação dos corações à uma situação experimental de estresse cardiovascular, bem como na recuperação do mesmo.

No período basal, a PSVE e as derivadas de contração e relaxamento do VE estavam reduzidas nos animais dos grupos D, I e DI em relação aos animais do grupo C. Vale destacar que os animais do grupo DI apresentaram maior  $+dP/dt$  em relação aos animais do grupo I. Notou-se também acentuada redução da PSVE nos grupos diabéticos (D e DI) quando comparados ao grupo I. Os animais dos grupos infartados (I e DI) apresentaram aumento da PDF quando comparados aos grupos não infartados (C e D). Ressaltando que o grupo I apresentou aumento adicional da PDF também em relação ao grupo DI. A FC, durante o registro da pressão ventricular, foi menor nos grupos diabéticos (D e DI) se comparada aos grupos normoglicêmicos (C e I) (Tabela 8).

No período de sobrecarga de volume (3<sup>o</sup> minuto) observou-se menor PSVE, FC e derivadas de contração ( $+dP/dt$ ) e relaxamento ( $-dP/dt$ ) do VE nos animais do grupo D, I e DI em relação aos animais do grupo C. A PDF foi maior nos grupos infartados (I e DI) em relação aos grupos C e D (Tabela 8).

Quando analisado o terceiro minuto de recuperação após a sobrecarga de volume, os animais dos grupos D, I e DI apresentaram PSVE, FC e derivada de contração ( $+dP/dt$ ) do VE reduzidas, quando comparados aos animais do grupo C. A PDF estava aumentada no grupo I em relação aos grupos C, D e DI. Já a derivada de relaxamento do VE ( $-dP/dt$ ) foi menor nos animais dos grupos D e I em relação aos animais do grupo C, todavia não foram observadas diferenças nesta variável para os animais do grupo DI (Tabela 8).

Em relação às avaliações intra-grupos, o grupo C apresentou aumento da PDF na sobrecarga de volume (sob), bem como na recuperação (rec) do mesmo, em relação ao período basal. No grupo D, notou-se que a derivada de contração do VE ( $+dP/dt$ ) estava



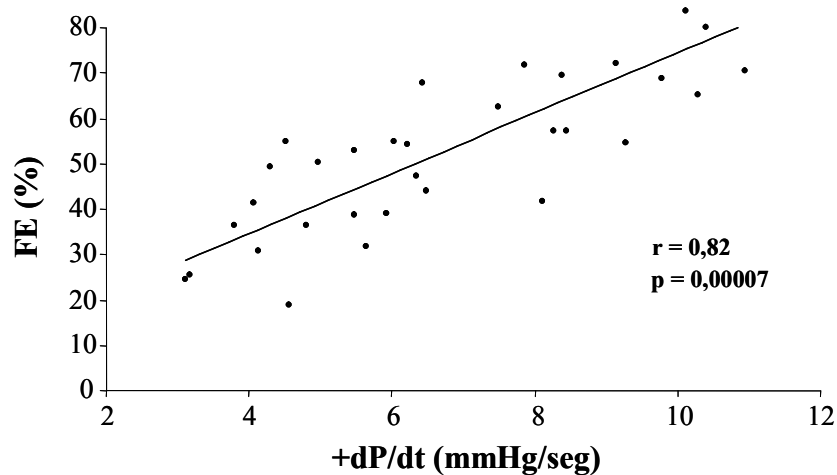
reduzida nos períodos de sobrecarga de volume e de recuperação, em relação ao período basal (Tabela 8).

**Tabela 8.** Pressão sistólica (PSVE), pressão diastólica final (PDF), frequência cardíaca (FC) e derivadas de contração (+dP/dt) e relaxamento (- dP/dt) do ventrículo esquerdo, no período basal, 3º minuto da sobrecarga de volume (sob) e 3º minuto da recuperação (rec) deste procedimento, nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).

Variáveis / Grupos	C	D	I	DI
PSVE basal	134±5	92±3*	113±4*†	93±4*†
PDF basal	5±0,3	6±1	20±2*†	12±3*†‡
FC basal	355±14	283±11*	311±20	267±20*
+ dP/dt basal	9.445±420	4.997±415*	4.642±457*	5.402±752*‡
- dP/dt basal	-7.186±169	-4.315±473*	-3.208±481*	-4.030±484*
PSVE sob	130±6	84±7*	91±9*	96±2*
PDF sob	9±0,4#	8±2	18±3*†	11±0,1*†
FC sob	336±9	264±18*	268±10*	273±23*
+ dP/dt sob	7.295±702	4.182±113*#	3.737±513*	5.354±908*
- dP/dt sob	-5.874±625	-3.746±212*	-2.498±378*	-3.957±566*
PSVE rec	130±7	80±7*	94±9*	98±2*
PDF rec	8±0,3#	8±2	21±2*†	10±0,5‡
FC rec	343±13	263±19*	267±11*	281±20*
+ dP/dt rec	8.453±858	4.070±112*#	3.902±479*	5.638±896*
- dP/dt rec	-5.924±723	-3.441±645*	-2.450±322*	-4.158±568

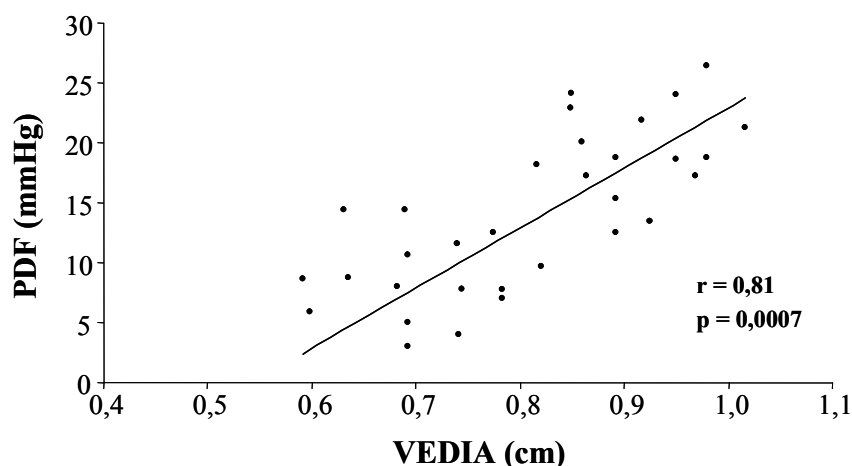
Valores representam média ± EPM. PSVE e PDF expressas em mmHg; FC expressa em bpm; +dP/dt e - dP/dt expressas em mmHg/seg). \* p<0,05 vs. C; † p<0,05 vs. D; ‡ p<0,05 vs. I; # p<0,05 vs. basal. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

Adicionalmente a estes achados, foi obtida uma correlação positiva entre a derivada de contração do VE (+dP/dt) e a fração de ejeção (FE) ( $r=0,82$ ,  $p<0,00007$ ) nos grupos estudados, evidenciando que os animais com maior contratilidade ventricular, avaliada pela cateterização do VE, apresentavam também maior FE, avaliada de forma não invasiva pelo ecocardiograma (Figura 15).



**Figura 15.** Correlação positiva entre a derivada de contração do ventrículo esquerdo (+dP/dt, em mmHg/seg) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FE, em %) nos grupos estudados. (Teste de Correlação de *Pearson*;  $r = 0,82$ ;  $p = 0,00007$ ).

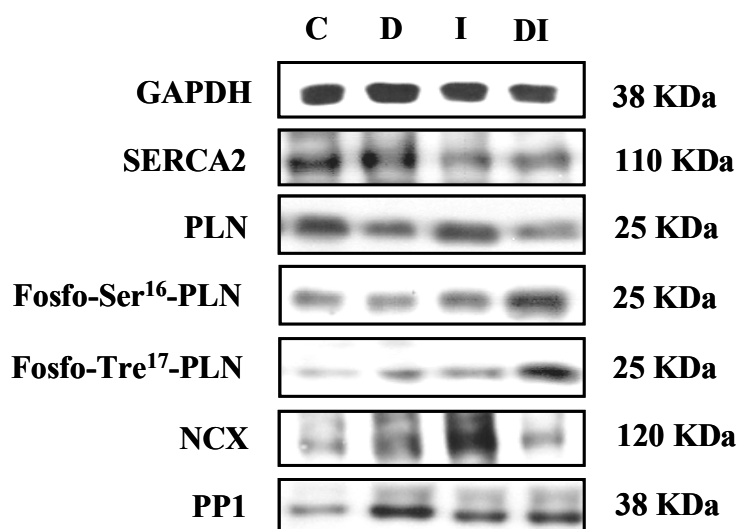
Outra correlação positiva também foi observada entre a cavidade do VE em diástole (VEDIA) e a pressão diastólica final (PDF) (Figura 16) ( $r=0,81$ ,  $p<0,0007$ ), demonstrando que os animais com maior dilatação da cavidade do VE em diástole, avaliada pelo ecocardiograma, apresentavam maior PDF, medida pela cateterização do VE. Estas duas correlações observadas nos grupos experimentais evidenciam o paralelismo entre as medidas não invasivas, pelo ecocardiograma, e as medidas invasivas, obtidas pela cateterização do VE.



**Figura 16.** Correlação positiva entre cavidade do ventrículo esquerdo em diástole (VEDIA, em cm) e pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDF, em mmHg) nos grupos estudados. (Teste de Correlação de *Pearson*,  $r = 0,81$ ;  $p = 0,0007$ ).

#### 4.3.7. Expressão de proteínas cardíacas envolvidas na regulação intracelular de $Ca^{2+}$

Com o objetivo de determinar os possíveis mecanismos celulares envolvidos nas disfunções sistólica e diastólica observadas nos grupos infartados, bem como os possíveis mecanismos envolvidos na menor disfunção ventricular observada no grupo DI em relação ao grupo I, avaliamos a expressão das proteínas cardíacas:  $Ca^{2+}$  ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2), fosfolambam (PLN), fosfolambam fosforilado na serina 16 (fosfo-Ser<sup>16</sup>-PLN), fosfolambam fosforilado na treonina 17 (fosfo-Tre<sup>17</sup>-PLN), proteína fosfatase 1 (PP1) e trocador  $Na^{+}/Ca^{2+}$  (NCX) (Tabela 9). Na Figura 17, podemos observar os blots representativos de todas as proteínas estudadas. Os resultados serão descritos a seguir.



**Figura 17.** Auto-radiografias representativas da expressão das proteínas estudadas:  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2), fosfolambam (PLN), fosfolambam fosforilado na serina 16 (fosfo-Ser<sup>16</sup>-PLN), fosfolambam fosforilado na treonina 17 (fosfo-Tre<sup>17</sup>-PLN), proteína fosfatase 1 (PP1) e trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) em homogeneizado ventricular dos grupos controle (C), diabético (D), infartado e diabético/infartado (DI). As imagens foram obtidas por meio de exposição das membranas a um filme fotográfico.

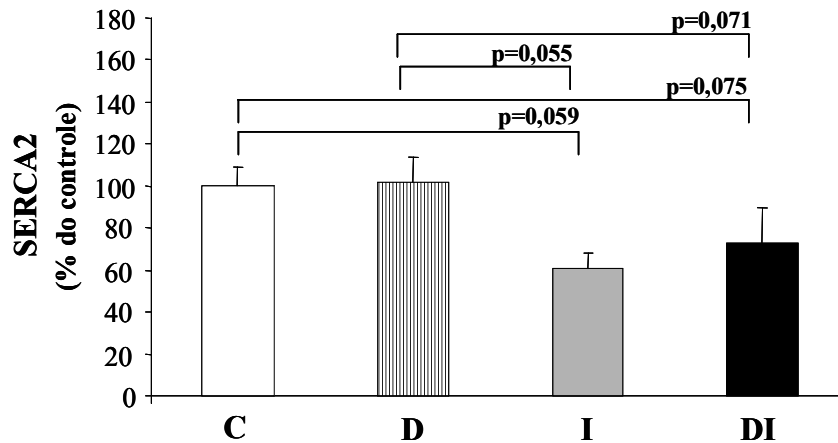
Na Tabela 9 são apresentados os valores das expressões das proteínas envolvidas na recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático em homogeneizados ventriculares dos grupos estudados.

**Tabela 9.** Expressão de proteínas cardíacas envolvidas na recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático em homogêneos ventriculares dos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).

Grupos/ Variáveis (em % do controle)	C	D	I	DI
<b>SERCA2</b>	100±4	102±5	61±3	73±7
<b>NCX</b>	100±8	138±9	148±13	56±4†‡
<b>SERCA2/NCX</b>	100±6	84±8	75±7	111±3†‡
<b>PLN</b>	100±4	119±6	112±7	51±5*†‡
<b>Fosfo-Ser16-PLN/PLN</b>	100±6	119±12	133±11	382±17*†‡
<b>Fosfo-Tre17-PLN/PLN</b>	100±6	148±6	129±8	443±54*†‡
<b>PP1</b>	100±6	74±4	94±6	46±2*†‡

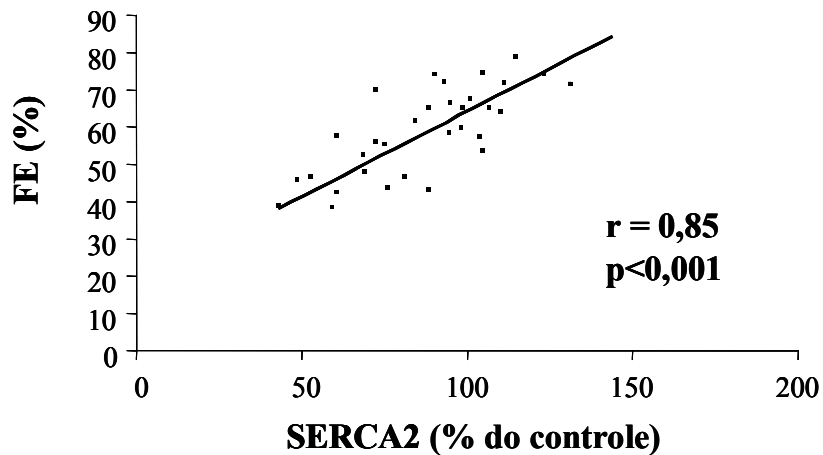
Valores representam média ± EPM. SERCA2 –  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático; NCX – trocador sódio/cálcio; PLN – fosfolambam; Fosfo-Ser16-PLN/PLN – fosfolambam fosforilado na serina 16; Fosfo-Tre17-PLN/PLN – fosfolambam fosforilado na treonina 17; PP1 – proteína fosfatase 1. \*  $p < 0,05$  vs. C; †  $p < 0,05$  vs. D; ‡  $p < 0,05$  vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newman Keuls.

Em relação à expressão de SERCA2, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados, porém os grupos infartados (I e DI) apresentaram tendência à redução na expressão dessa proteína quando comparados com os grupos não infartados (C e D) (Tabela 9 e Figura 18).

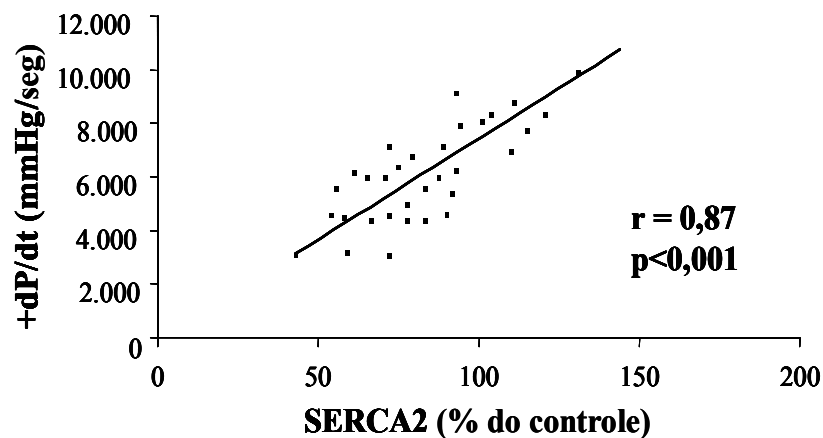


**Figura 18.** Expressão da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2, % do controle) em homogeneizado ventricular dos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

Além disso, foram obtidas correlações positivas entre a expressão de SERCA2 e a fração de ejeção (FE) ( $r = 0,85$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 19), bem como entre a expressão da SERCA2 e a derivada de contração do VE ( $+dP/dt$ ) ( $r = 0,87$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 20) nos grupos experimentais. Estas correlações evidenciam que, apesar de não terem sido obtidas diferenças estatisticamente significantes na expressão da SERCA2, animais com maior expressão da SERCA2 apresentavam melhor função sistólica avaliada tanto de forma não invasiva (ecocardiograma) quanto de forma invasiva (canulação do VE).

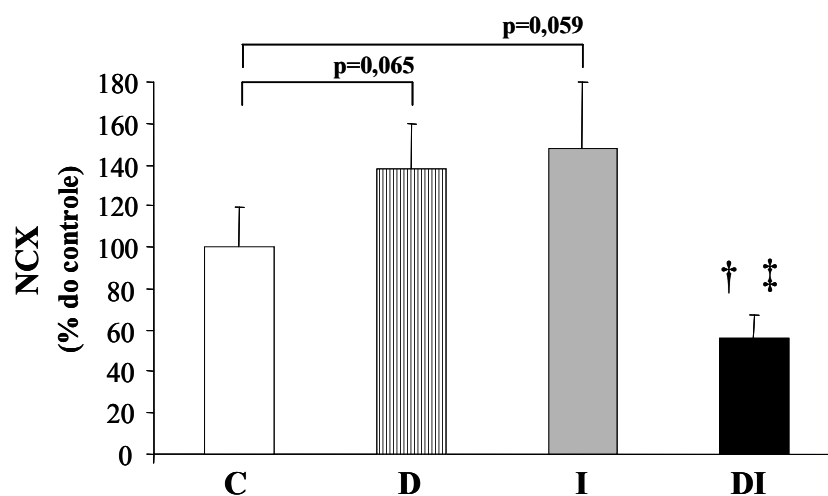


**Figura 19.** Correlação positiva entre a expressão da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2, % do controle) e fração de ejeção (FE, em %) nos grupos estudados. (Teste de Correlação de *Pearson*,  $r = 0,85$ ;  $p = 0,001$ ).



**Figura 20.** Correlação positiva entre a expressão da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2, % do controle) e derivada de contração do VE (+dP/dt, em mmHg/seg) nos grupos estudados. (Teste de Correlação de *Pearson*,  $r = 0,87$ ;  $p = 0,001$ ).

Para que o relaxamento ventricular ocorra a contento, o  $\text{Ca}^{2+}$  que não foi recaptado pelo retículo sarcoplasmático através da SERCA2 precisa ser extruído e o principal mecanismo de extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  da célula é o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX). Conforme pode ser observado na Figura 21, os grupos D e I apresentaram tendência a aumento na expressão do NCX, quando comparados ao grupo C, porém sem diferença estatisticamente significativa. Enquanto que, interessante, os animais DI apresentaram reduzida expressão do NCX em comparação aos grupos D e I, porém sem diferença significativa em relação ao grupo C (Figura 21 e Tabela 9).

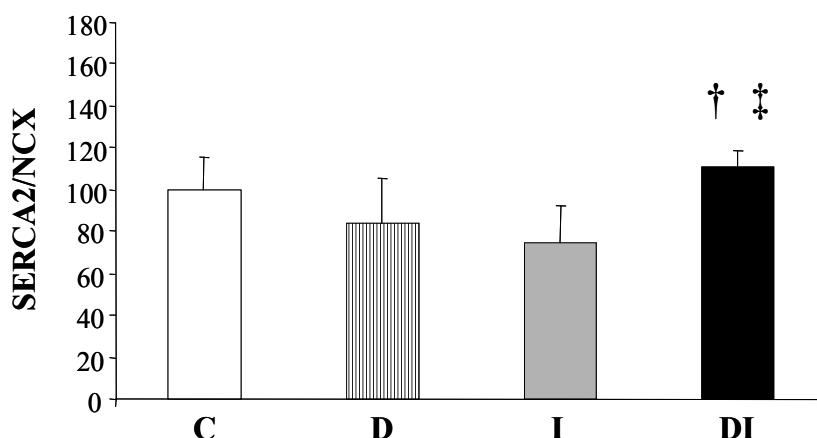


**Figura 21.** Expressão do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) em homogeneizado ventricular dos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). †  $p < 0,05$  vs. D; ‡  $p < 0,05$  vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

Como o conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático depende da recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  pela SERCA2 relativa à eliminação transsarcolemal de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo NCX, calculou-se a razão SERCA2/NCX para todos os grupos estudados. Como se pode observar na

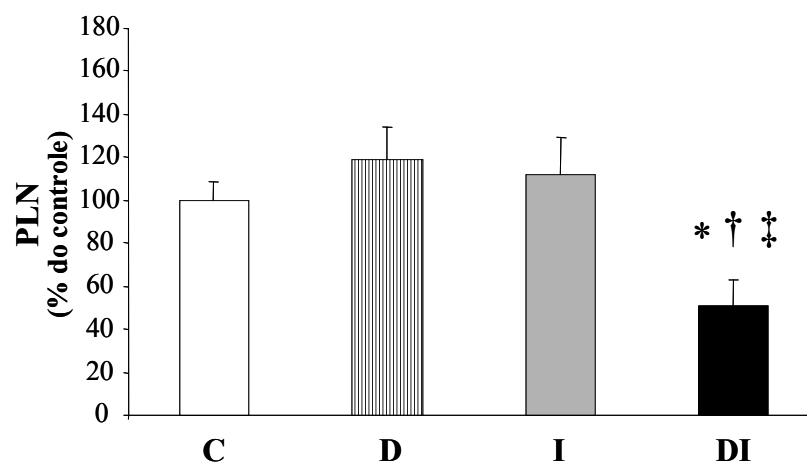


Figura 22, não houve diferença entre os grupos C, D e I. O grupo DI apresentou maior razão da expressão de SERCA2 pela expressão de NCX em relação aos grupos D e DI, porém sem diferença significativa quando comparado com o grupo C (Figura 22 e Tabela 9).



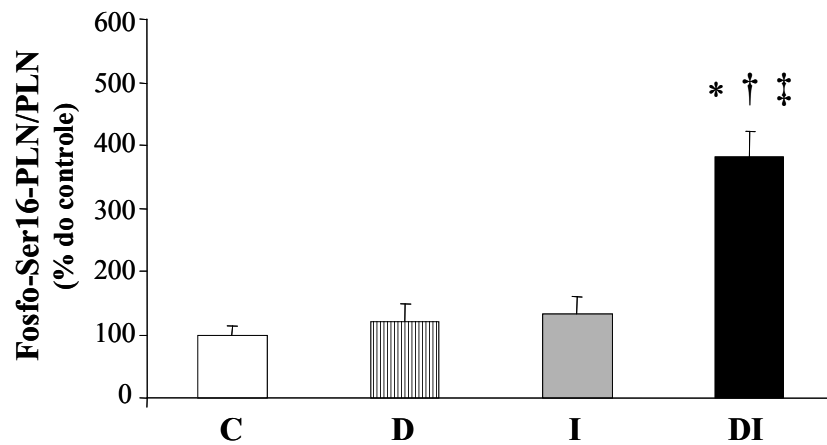
**Figura 22.** Razão da expressão da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2) e trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) em homogeneizado ventricular dos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). †  $p < 0,05$  vs. D; ‡  $p < 0,05$  vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newman Keuls.

A atividade da SERCA2 é controlada pelo fosfolambam (PLN), o qual, na sua forma defosforilada, diminui a afinidade da SERCA2 pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . No entanto, a estimulação  $\beta$ -adrenérgica induz fosforilação do PLN na serina 16 e na treonina 17, via PKA e CAMKII, respectivamente. Em relação à expressão de PLN total, não foram observadas diferenças entre os grupos C, D e I. No entanto, os animais do grupo DI apresentaram reduzida expressão de PLN total em relação aos animais dos grupos C, D e I (Figura 23, Tabela 9).

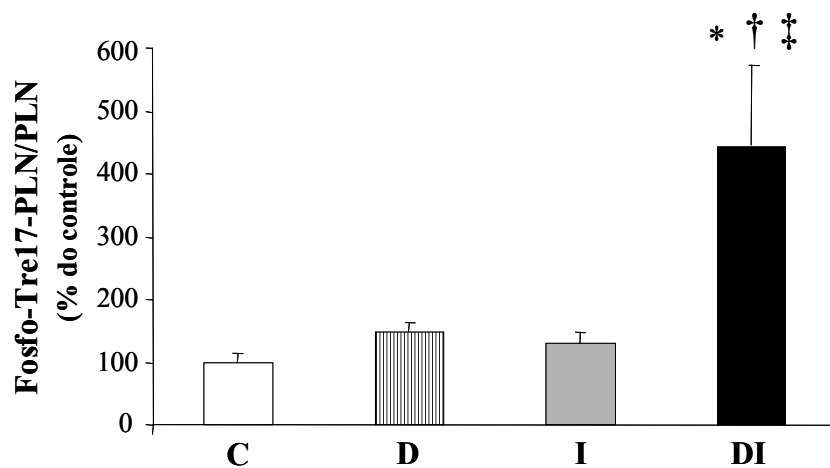


**Figura 23.** Expressão da fosfolambam total (PLN, % do controle) em homogeneizado ventricular dos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). \*  $p < 0,05$  vs. C; †  $p < 0,05$  vs. D; ‡  $p < 0,05$  vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

De forma semelhante ao observado no PLN total, não foram verificadas diferenças entre os grupos C, D, I na expressão do PLN fosforilado na serina 16 ou na treonina 17. Entretanto, o grupo DI apresentou aumento significativo da expressão de PLN fosforilado tanto na serina 16 (fosfo-Ser<sup>16</sup>-PLN) (Figura 24) quanto na treonina 17 (fosfo-Tre<sup>17</sup>-PLN) (Figura 25) quando comparado aos grupos C, D e I (Tabela 9).

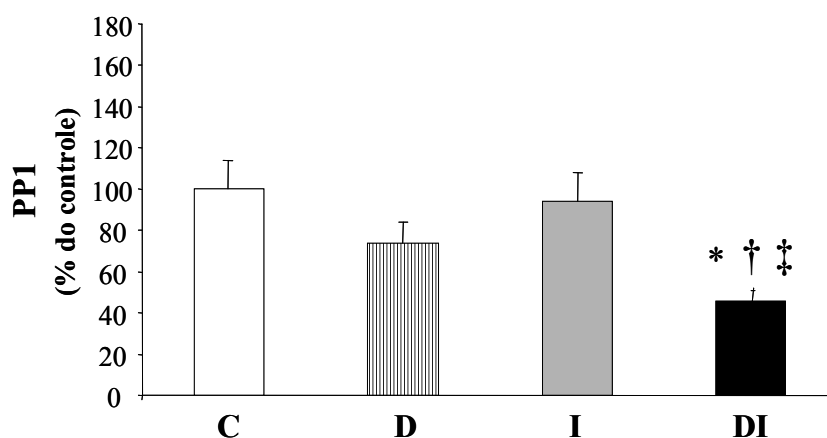


**Figura 24.** Expressão de fosfolambam fosforilado na serina 16 (fosfo-Ser16-PLN/PLN, % do controle) em homogeneizado ventricular dos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). \*  $p < 0,05$  vs. C; †  $p < 0,05$  vs. D; ‡  $p < 0,05$  vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.



**Figura 25.** Expressão de fosfolambam fosforilado na treonina 17 (fosfo-Tre17-PLN/PLN, % do controle) em homogeneizado ventricular dos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). \*  $p < 0,05$  vs. C; †  $p < 0,05$  vs. D; ‡  $p < 0,05$  vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

Como podemos observar na Figura 26, não notamos diferenças entre os grupos C, D e I na expressão da proteína fosfatase subtipo 1 (PP1). Os animais do grupo DI apresentaram redução na expressão desta proteína quando comparados com os animais dos grupos C, D e I, evidenciando um possível mecanismo envolvido na hiperfosforilação do PLN na serina 16 e na treonina 17 (Tabela 9).



**Figura 26.** Expressão da proteína fosfatase 1 (PP1, % do controle) em homogeneizado ventricular dos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). \*  $p < 0,05$  vs. C; †  $p < 0,05$  vs. D; ‡  $p < 0,05$  vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newman Keuls.

#### ***4.4. Avaliações da função autonômica cardiovascular***

##### ***4.4.1. Sensibilidade barorreflexa***

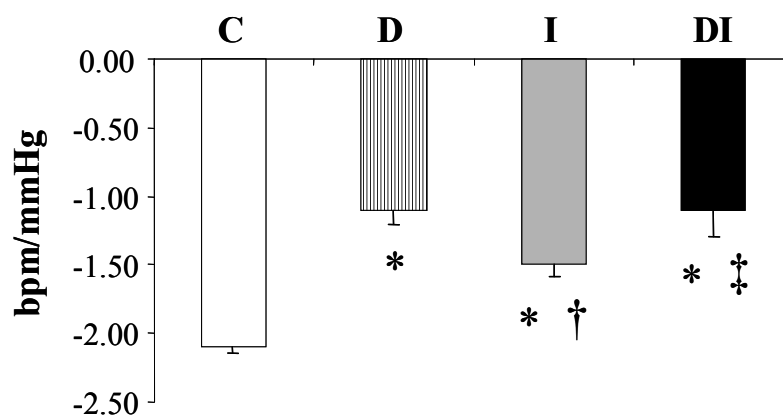
A resposta bradicárdica a aumentos de pressão arterial (PA) após doses crescentes de Fenilefrina, representada pelo índice de bradicardia reflexa (IBR), estava reduzida nos animais dos grupos D, I e DI quando comparados aos animais do grupo C. Além disto, nos grupos diabéticos (D e DI) observou-se um prejuízo adicional do IBR em relação ao grupo I (Tabela 10 e Figura 27).

A resposta taquicárdica a quedas de PA após a injeção de Nitroprussiato de Sódio, representada pelo índice de taquicardia reflexa (ITR), também estava reduzida nos animais dos grupos D, I, e DI quando comparada aos animais do grupo C. Além disso, notou-se um prejuízo adicional no ITR para o grupo DI em relação ao grupo D (Tabela 10, Figura 28).

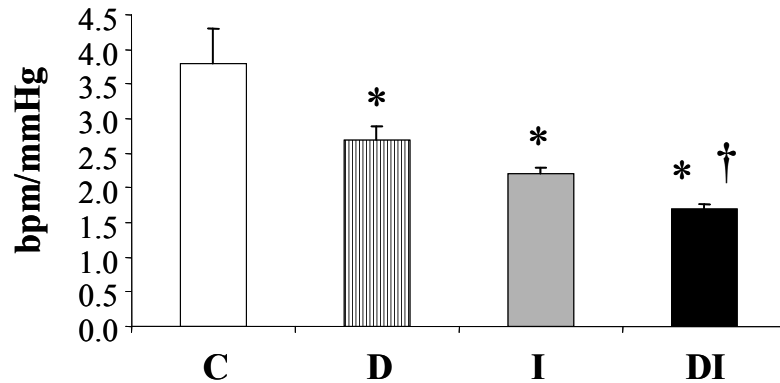
**Tabela 10.** Índices de bradicardia (IBR) e de taquicardia (ITR) reflexas nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).

Grupos/ Sensibilidade Baroreflexa	C	D	I	DI
IBR (bpm/mmHg)	-2,1 ± 0,04	-1,1±0,16*	-1,58±0,09*†	-1,1± 0,10*‡
ITR (bpm/mmHg)	3,8 ± 0,5	2,7 ± 0,2*	2,2 ± 0,1*	1,7±0,06*†

Valores representam média ± EPM. \* p<0,05 vs. C; † p<0,05 vs. D; ‡ p< 0,05 vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

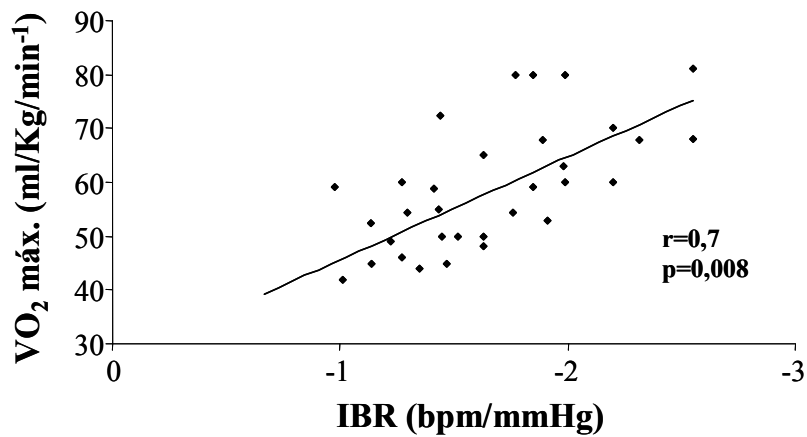


**Figura 27.** Índice de bradicardia reflexa (IBR) (bpm/mmHg) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). \* p<0,05 vs. C; † p<0,05 vs. D; ‡ p<0,05 vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.



**Figura 28.** Índice de taquicardia reflexa (ITR) (bpm/mmHg) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). \*  $p < 0,05$  vs. C; †  $p < 0,05$  vs. D. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

Somando-se a estes resultados, observou-se uma correlação positiva entre a sensibilidade barorreflexa (avaliada índice de bradicardia reflexa, IBR) e o consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$  máx.) nos grupos estudados (Figura 29), evidenciando que os animais com maiores índice de bradicardia reflexa foram os que atingiram maiores valores de  $VO_2$  máx. aos 90 dias de protocolo.



**Figura 29.** Correlação positiva entre índice de bradicardia reflexa (IBR, em bpm/mmHg) e o consumo máximo de oxigênio (VO<sub>2</sub> máx., em ml/Kg/min<sup>-1</sup>) nos grupos estudados. (Teste de Correlação de *Pearson*  $r = 0,7$ ;  $p = 0,008$ ).

#### 4.4.2. Variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial sistólica

A partir dos 30 minutos de registro basal da FC (intervalo de pulso) e PA momento a momento, investigou-se também a função autonômica dos grupos experimentais através da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) (Tabela 11) e da pressão arterial sistólica (VPAS) (Tabela 12), tanto no domínio do tempo quanto no domínio da frequência.



**Tabela 11.** Valores da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e da frequência nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).

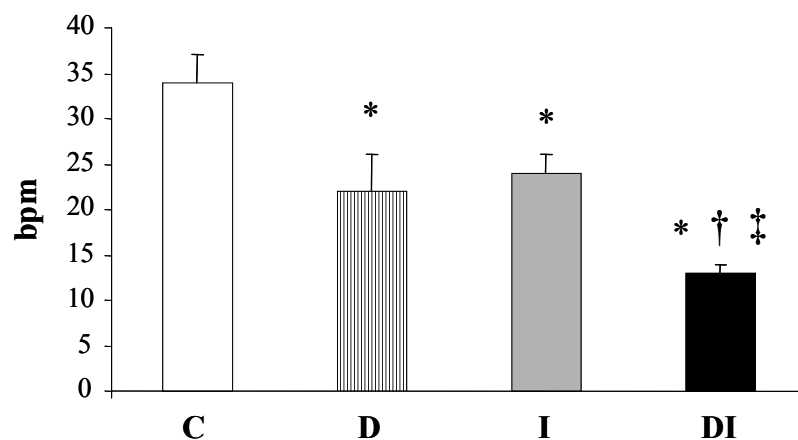
Grupos/ Variáveis	C	D	I	DI
<b>Domínio do Tempo</b>				
<b>SDNN (bpm)</b>	34±3	22±4*	24±2*	13±1*†‡
<b>Variância total (ms<sup>2</sup>)</b>	23±0,8	15±2*	13±1*	10±1*†
<b>Domínio da Frequência</b>				
<b>LF (ms<sup>2</sup>)</b>	3,1±0,5	1,0±0,2	1,5±0,2	0,4±0,1
<b>HF (ms<sup>2</sup>)</b>	11,0±1,4	6,8±1,2	6,7±1,1	5,6±1,0

Valores representam média ± EPM. SDNN – média dos desvios padrões; LF – banda de baixa frequência; HF – banda de alta frequência. \* p<0,05 vs. C; † p<0,05 vs. D; ‡ p<0,05 vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newman Keuls.

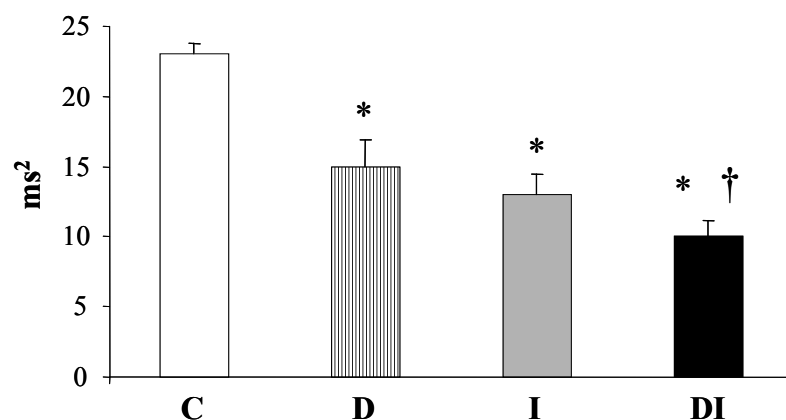
A VFC, representada pela média dos desvios padrões (SDNN – expressa em bpm), estava reduzida nos grupos experimentais D, I e DI quando comparada ao grupo controle. Além disso, a associação de diabetes e infarto (DI) induziu redução adicional do desvio dos intervalos de pulso também em relação aos animais dos grupos D e I (Tabela 11 e Figura 30).

Outra forma bastante utilizada na literatura de expressar a VFC no domínio do tempo é através da variância total do intervalo de pulso (IP) (expressa em ms<sup>2</sup>). Na Figura 31 pode-se observar que os animais dos grupos D, I e DI apresentaram redução

da variância do IP quando comparados aos animais do grupo C. Adicionalmente, o grupo DI apresentou redução adicional dessa variável se comparado com o grupo D (Tabela 11).



**Figura 30.** Média dos desvios padrões do intervalo de pulso (SDNN, expressa em bpm) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). \*  $p < 0,05$  vs. C; †  $p < 0,05$  vs. D; ‡  $p < 0,05$  vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

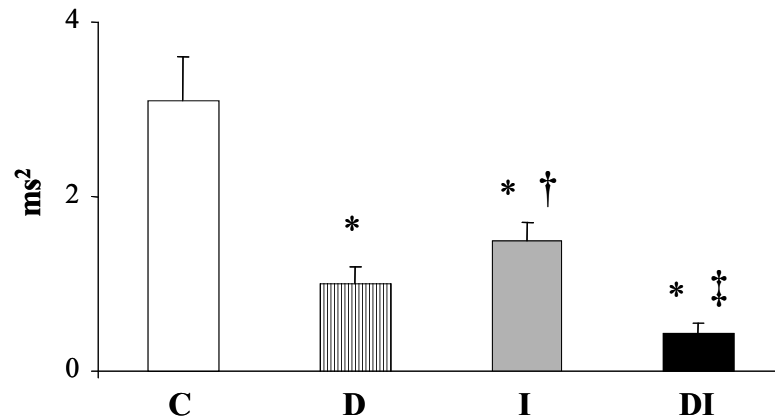


**Figura 31.** Variância total do intervalo de pulso (expressa em ms<sup>2</sup>) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). \* p<0,05 vs. C; † p<0,05 vs. D. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

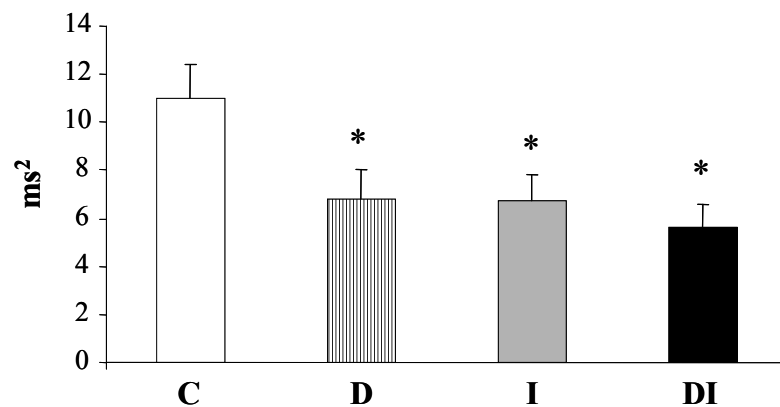
A VFC no domínio da frequência (análise espectral) foi expressa pela densidade espectral em ms<sup>2</sup> para o tacograma, tanto na banda de baixa frequência (LF), indicativa de modulação simpática cardíaca, quanto para a banda de alta frequência (HF), indicativa de modulação parassimpática cardíaca (Tabela 11).

Na Figura 32, observou-se redução da banda de LF nos grupos D, I e DI se comparados ao grupo C. Os animais diabéticos (D e DI) apresentaram redução da banda de LF em relação aos animais normoglicêmicos (C e I). Vale ressaltar que a associação entre diabetes e infarto (grupo DI) acarretou redução adicional da banda de LF comparando-se ao infarto (grupo I) isoladamente (Tabela 11).

Em relação à banda de HF (Figura 33), os grupos experimentais D, I e DI apresentaram redução significativa da banda de HF quando comparados ao grupo C. Não sendo observada diferenças na banda de HF entre os grupos D, I e DI (Tabela 11).



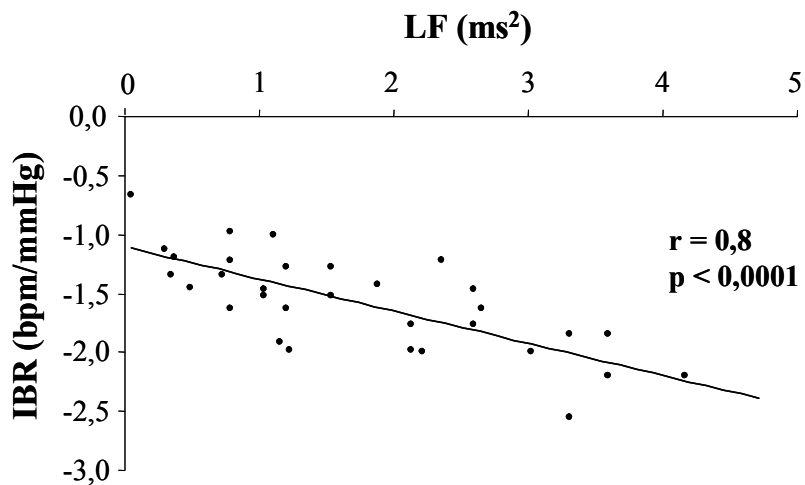
**Figura 32.** Banda de baixa frequência (LF, em  $ms^2$ ) do intervalo de pulso nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). \*  $p < 0,05$  vs. C; †  $p < 0,05$  vs. D; ‡  $p < 0,05$  vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.



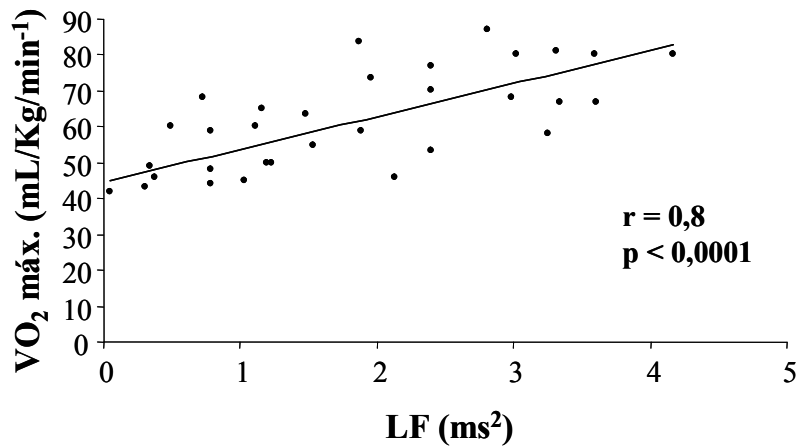
**Figura 33.** Banda de alta frequência do intervalo de pulso (HF, em  $ms^2$ ) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). \*  $p < 0,05$  vs. C. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

Além disso, observou-se uma correlação positiva entre a banda de LF do IP ( $\text{ms}^2$ ) e a sensibilidade barorreflexa, avaliada pelo índice de bradicardia reflexa (IBR, em  $\text{bpm/mmHg}$ ) (Figura 34). Esta correlação sugere que uma redução mais acentuada da banda de LF (aumento da modulação simpática) está relacionada com prejuízo da sensibilidade barorreflexa (IBR).

Outra correlação positiva também foi obtida entre a banda de LF do IP (em  $\text{ms}^2$ ) e o  $\text{VO}_2$  máx. (em  $\text{mL/Kg/min}^{-1}$ ) (Figura 35), demonstrando que os animais que possuíam exacerbada redução da banda de LF do IP (aumento da modulação simpática) apresentavam reduzidos valores de  $\text{VO}_2$  máx.



**Figura 34.** Correlação positiva entre a banda de baixa frequência (LF, em  $\text{ms}^2$ ) do intervalo de pulso e índice de bradicardia reflexa (IBR, em  $\text{bpm/mmHg}$ ) nos grupos estudados (Teste de Correlação de *Pearson*,  $r = 0,8$ ;  $p < 0,0001$ ).



**Figura 35.** Correlação positiva entre a banda de baixa frequência (LF, em ms<sup>2</sup>) do intervalo de pulso e o consumo máximo de oxigênio (VO<sub>2</sub> máx., mL/Kg/min<sup>-1</sup>) nos grupos estudados (Teste de Correlação de *Pearson*,  $r = 0,8$ ;  $p < 0,0001$ ).

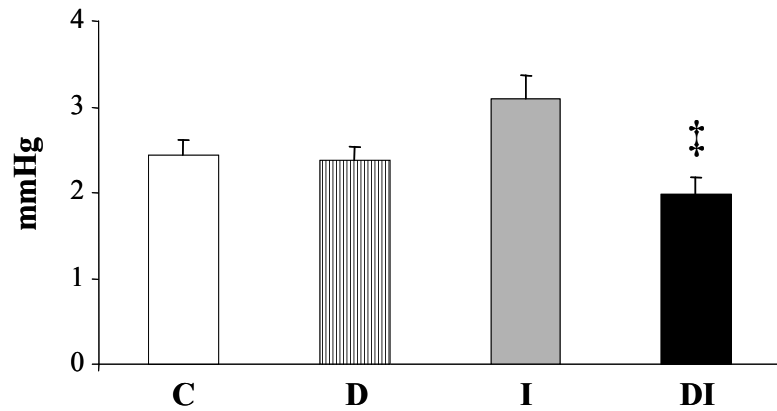
A VPAS, representada pela média dos desvios padrões (SDNN – expressa em mmHg), estava reduzida nos animais do grupo DI quando comparados com os animais do grupo I, não sendo observadas diferenças estatisticamente significantes entre os outros grupos experimentais (Tabela 12 e Figura 36).

**Tabela 12.** Valores da variabilidade da pressão arterial sistólica no domínio do tempo e da frequência nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI).

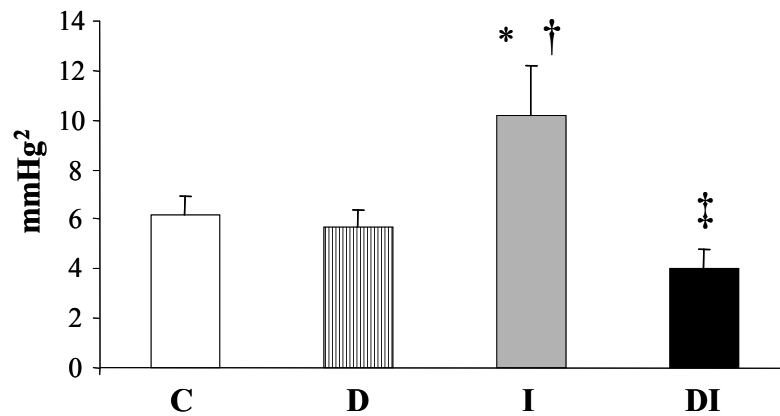
<b>Grupos/ Variáveis</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>I</b>	<b>DI</b>
<b>Domínio do Tempo</b>				
<b>SDNN (mmHg)</b>	2,4±0,1	2,3±0,1	3,1±0,2	1,9±0,2‡
<b>Variância total (mmHg<sup>2</sup>)</b>	6,1±0,8	5,7±0,7	9,0±1,8*†	4,0±0,6‡
<b>Domínio da Frequência</b>				
<b>LF (mmHg<sup>2</sup>)</b>	3,0±0,4	1,8±0,4	6,6±1,4*†	1,0±0,2*‡

Valores representam média ± EPM. SDNN – média dos desvios padrões; LF – banda de baixa frequência; HF – banda de alta frequência. \* p<0,05 vs. C; † p<0,05 vs. D; ‡ p<0,05 vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

Outra forma bastante utilizada na literatura para se expressar a VPAS é através da variância total (mmHg<sup>2</sup>). Na Figura 37 observa-se aumento desta variável no grupo I quando comparado com os grupos C e D. Vale ressaltar que os animais do grupo DI apresentaram redução da variância total da PAS em comparação aos animais do grupo I (Tabela 12).



**Figura 36.** Média dos desvios padrões (SDNN) da pressão arterial sistólica (expressa em mmHg) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). ‡  $p < 0,05$  vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

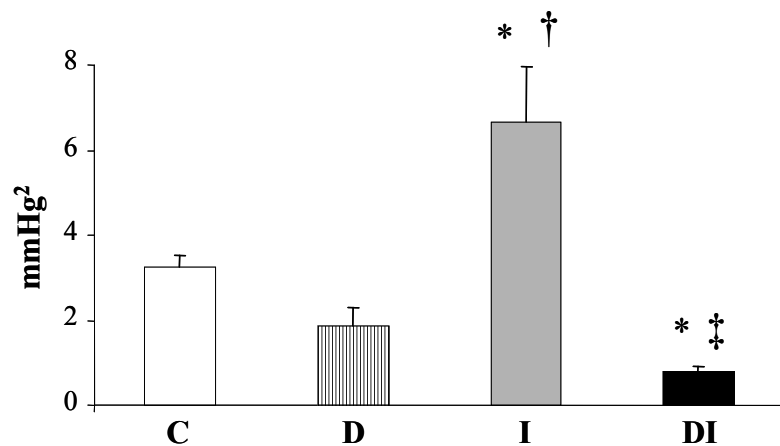


**Figura 37.** Variância total da pressão arterial sistólica (expressa em  $\text{mmHg}^2$ ) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). \*  $p < 0,05$  vs. C; †  $p < 0,05$  vs. D; ‡  $p < 0,05$  vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.



A VPAS no domínio da frequência (análise espectral) foi expressa pela densidade espectral em  $\text{mmHg}^2$  para o sistograma pela banda de baixa frequência (LF), indicativa de modulação simpática vasomotora.

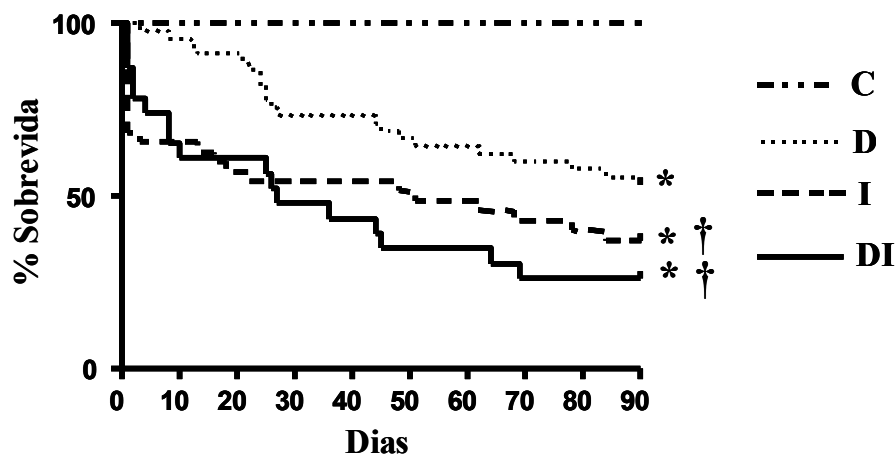
Conforme se pode observar na Figura 38, o grupo I apresentou aumento da banda de LF quando comparado aos grupos C e D. Além disso, os animais DI apresentaram redução da banda de LF se comparado aos animais dos grupos C e I (Tabela 12).



**Figura 38.** Banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica (LF, em  $\text{mmHg}^2$ ) nos grupos controle (C), diabético (D), infartado (I) e diabético/infartado (DI). \*  $p < 0,05$  vs. C; †  $p < 0,05$  vs. D; ‡  $p < 0,05$  vs. I. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do post hoc de Student Newmann Keuls.

#### 4.5. Avaliação da mortalidade

Acompanhando a mortalidade no curso temporal de 90 dias (Curva de Kaplan-Meier), observou-se que o grupo D (45%) apresentou maior mortalidade quando comparado com o grupo C (0%). Além disso, a mortalidade foi semelhante entre os grupos infartados (I: 63% e DI: 74%), porém foi maior nesses grupos (I e DI) em relação aos grupos não infartados (C e D) (Figura 39).



**Figura 39.** Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. Observe os percentuais de mortalidade nos grupos controle (C: 0%), diabético (D: 45%), infartado (I: 63%) e diabético/infartado (74%) durante 90 dias de protocolo. \*  $p < 0,05$  vs. C; †  $p < 0,05$  vs. D.

## **5. DISCUSSÃO**

Na busca da melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas alterações observadas em diabéticos pós-infarto do miocárdio (IM), o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do IM experimental nas alterações ventriculares, hemodinâmicas e autonômicas de ratos diabéticos por estreptozotocina.

Os principais resultados do presente estudo foram que tanto o diabetes quanto o infarto do miocárdio induziram disfunções ventriculares, cardio-respiratórias e autonômicas nos animais estudados. O grupo infartado apresentou maior área de infarto e do eixo maior e cavidade do VE ao final do protocolo, o que não foi observado no grupo diabético/infartado. Além disso, a disfunção sistólica (avaliada de forma não invasiva e invasiva) foi atenuada no grupo diabético/infartado, assim como a pressão diastólica final foi menor no grupo diabético/infartado quando comparado ao grupo somente infartado. Adicionalmente, observou-se melhor perfil molecular das proteínas relacionadas à recaptação de  $Ca^{2+}$  intracelular no grupo diabético/infartado em comparação ao grupo infartado. Entretanto, exacerbada disfunção autonômica foi observada no grupo diabético/infartado em relação ao grupo infartado. Por fim, ao final dos 90 dias de acompanhamento, a mortalidade foi semelhante entre os animais infartados, diabéticos ou não.

### ***5.1. Avaliações metabólicas***

O presente estudo confirma os resultados obtidos em trabalhos anteriores que demonstraram os prejuízos metabólicos induzidos pelo diabetes por STZ. A estreptozotocina foi descoberta e isolada primariamente pelos seus efeitos antibióticos e antineoplásicos. Posteriormente, foi 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; Junod et al., 1969). 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). No presente estudo, 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., 2000a; Wichi et al., 2007; De Angelis et al., 2007).

Ao contrário do observado nos grupos diabéticos, os animais normoglicêmicos (C e I) aumentaram seus pesos corporais durante os 90 dias de protocolo. Todavia, o grupo I apresentou menor peso corporal quando comparado ao grupo C, na avaliação final. De forma semelhante, Raya et al. (1997) evidenciaram reduzido peso corporal em ratos com 23 dias de IM, provavelmente explicado pelas lesões traumáticas pós-cirúrgicas nestes animais. Vale ressaltar que a associação do diabetes e infarto do

miocárdio não induziu redução adicional no peso corporal em relação ao grupo somente diabético.

## ***5.2. Avaliações cardio-respiratórias***

Utilizando medidas diretas da pressão arterial batimento a batimento, as avaliações hemodinâmicas basais, no presente estudo, confirmaram a redução da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) no grupo diabético e diabético/infartado em relação ao controle. De fato, estudos do nosso laboratório têm demonstrado repetidamente queda de PA basal em ratos diabéticos em diferentes tempos de diabetes experimental (Maeda et al, 1995a; Dall 'Ago et al, 1997; Schaan et al, 1997; De Angelis et al, 2000b). Entretanto, existem observações de aumento de PA nestes animais (Kawashima et al, 1978; Bunãg et al, 1982; Fein et al, 1991; Taked et al, 1991). 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).

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., 2000b), pudessem contribuir para redução da pressão arterial em animais diabéticos, uma vez que, a pressão arterial relaciona-se diretamente com o débito cardíaco. De fato, no presente estudo observamos disfunção sistólica e diastólica no grupo diabético, que pode ter colaborado com a redução da PA.

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. De fato, é possível que uma excessiva perda de volume pudesse explicar a redução do DC e conseqüentemente redução de fluxo sanguíneo em outros territórios em diabéticos (Brands & Fitzgerald, 2001). Certamente 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 & Franchini, 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).

Já é conhecido que o IM está associado à hipotensão, tanto em humanos (Grassi & Mancia, 1994) quanto em animais de experimentação. Mill et al. (1997) observaram hipotensão em ratos avaliados com 30 dias de IM, sendo esta também observada por Koike et al. (1996) com 8 dias pós-IM. No presente trabalho, as avaliações hemodinâmicas realizadas após 90 dias de IM mostraram redução da PAS e inalteração da FC no grupo I quando comparado ao grupo C. Outros autores observaram previamente, taquicardia e hipotensão nos animais com 1 e 10 dias após IM (Mill et al., 1991; Meyrelles et al., 1994; Lacerda, 2000), e, também em nosso laboratório, De Angelis et al. 2001 demonstraram reduzida PA e FC em animais com 8 semanas de IM. Por outro lado, existem estudos que mostram que ratos submetidos ao IM, não apresentam hipotensão e bradicardia 7 e 15 dias após o procedimento cirúrgico, mantendo-se em níveis próximos à normalidade (Mill et al., 1997). A FC também não sofreu alteração estatística nos animais infartados (I) em relação aos animais C, revertendo possivelmente, o quadro de taquicardia observado em ratos com apenas um dia de IM (Lacerda, 2000).

Essa hipotensão arterial poderia ser atribuída a algum grau de comprometimento do coração isquêmico, com conseqüente redução do débito cardíaco e/ou a redução da atividade simpática periférica sobre os vasos de resistência. Vale lembrar que a atividade simpática periférica pode ser regulada diferencialmente em diversos territórios, obedecendo à regulação de vários fatores neuro-humorais ajustados local ou sistemicamente, por meio de reflexos comandados por diferentes receptores (Abboud, 1983). As análises da função ventricular revelam comprometimento da função sistólica e diastólica nos animais infartados. Todavia, evidências observadas pela análise espectral, ou seja, maior modulação simpática para os vasos e coração, sugerem um estado de hiperatividade simpática compensatória e falha na bomba cardíaca (Lombardi et al., 1996).

Por fim, vale destacar que nos animais do grupo associação (diabetes/infarto) observou-se redução da PA e FC em relação ao grupo C, porém a associação entre as duas patologias não potencializou o efeito hipotensor do DM e/ou do IM. Novamente no grupo associação o prejuízo na função cardíaca parece ser um importante determinante da redução da PA, uma vez que a modulação simpática vascular mostra-se elevada neste grupo.

Adicionalmente avaliamos o  $VO_2$  máx. nos grupos estudado. O teste de esforço juntamente com medidas de trocas gasosas ( $VO_2$  máx.) é um excelente parâmetro para quantificar a capacidade cardio-respiratória, o nível de condicionamento físico, bem como detectar algum tipo de patologia associada, tanto para o indivíduo atleta quanto para àqueles com doenças preexistentes (Lange, 2001). O  $VO_2$  máx. representa o maior



pico de captação de oxigênio atingido durante incrementos de esforço físico. A redução deste parâmetro pode ser resultado de diversos fatores, como exemplo, uma limitação do débito cardíaco, um reduzido fluxo sanguíneo periférico e/ou prejuízo no metabolismo da musculatura esquelética (Francis et al., 2001).

A utilização do  $VO_2$  máx. na prática clínica tem sido considerada um importante indicador prognóstico em indivíduos com insuficiência cardíaca (IC), uma vez que oferece padrões fidedignos para o diagnóstico clínico. A avaliação das respostas cardio-respiratórias ao exercício agudo e crônico, de forma semelhante ao realizado em humanos, tem sido uma prática comum na investigação de modelos animais de diferentes patologias (Wisloff et al., 2001; Rodrigues et al., 2007; Rolim et al., 2006). Assim como na prática clínica, a medida do  $VO_2$  máx é uma ferramenta que se destaca por ser não invasiva e por sua grande validade no estudo da capacidade funcional dos animais, além de ser utilizada para prescrição de treinamento físico, bem como para avaliação dos efeitos desta abordagem.

Os valores obtidos de  $VO_2$  máx. no presente trabalho estão de acordo com os previamente encontrados na literatura para ratos adultos normais (Wisloff et al., 2001). Recentemente, demonstramos que se pode estimar o  $VO_2$  a partir dos resultados do teste de esforço máximo utilizando-se a equação de regressão linear entre  $VO_2$  e teste de esforço. Além disso, diferenças de capacidade aeróbia podem ser detectadas pelo teste de esforço, uma vez que a velocidade máxima obtida no teste de esforço foi correlacionada com o  $VO_2$  máximo, em ratos machos saudáveis e diabéticos (Rodrigues et al., 2007; Rodrigues et al., 2006).

Em pacientes diabéticos, a medida do  $\text{VO}_2$  máx, também tem sido bastante utilizada clinicamente, uma vez que esses indivíduos encontram-se com capacidade física reduzida em função dos distúrbios metabólicos e cardiovasculares decorrentes dessa doença (Ming et al., 2001).

Os resultados do presente estudo mostraram uma diminuição do  $\text{VO}_2$  máx para os animais D, I e DI em relação ao C, sendo que os animais dos grupos infartados (I e DI) apresentaram queda mais acentuada desta variável quando comparados com os grupos D e C. A redução do consumo máximo de oxigênio e, conseqüentemente, da capacidade de esforço nos animais diabéticos pode ser explicada pela redução da função ventricular observada 30 dias após a indução por STZ (Wichi et al., 2007), bem como no presente estudo, avaliada pelo ecocardiograma e pela cateterização do VE. Além disto, alterações mitocondriais que reduzem a capacidade oxidativa muscular esquelética tem efeito considerável na intolerância ao esforço de ratos diabéticos crônicos (Rouyer et al., 2007).

Em pacientes com disfunção ventricular, a intolerância ao exercício é uma manifestação clínica bastante comum e se correlaciona com o grau de disfunção cardíaca e à severidade da doença (Jikuhara et al., 1997; Negrão & Middlekauff, 2008). Bigi et al. (2001) demonstraram uma reduzida capacidade de esforço,  $\text{VO}_2$  máx. e uma correlação positiva entre a queda do  $\text{VO}_2$  máx e o limiar anaeróbico em pacientes após evento isquêmico. Em nosso trabalho observamos que os animais infartados (I e DI) apresentavam um  $\text{VO}_2$  máx. reduzido em 90 dias em relação as suas avaliações iniciais, o que sugere um agravamento das disfunções cardio-respiratórias ao longo do protocolo, provavelmente associada ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca nesses animais.

Estes resultados corroboram dados da literatura, nos quais animais com 5 semanas após IM apresentaram reduções no consumo máximo de oxigênio e do débito cardíaco o que limita o transporte de oxigênio para a musculatura esquelética, promovendo um desbalanço entre oferta e necessidade de oxigênio em relação aos incrementos de esforço (Rolim et al., 2006). Além disso, mudanças no tipo de fibra muscular (tipo 1 para 2) e a redução da massa muscular, além da reduzida vasodilatação periférica, podem contribuir para o decréscimo da capacidade de esforço e  $VO_2$  máx. em indivíduos com IC (Negrão & Middlekauff, 2008).

### ***5.3. Avaliações ventriculares***

#### ***5.3.1 Morfometria e função cardíaca: avaliações não invasivas e invasivas da função ventricular esquerda***

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 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. Dessa forma, os efeitos do infarto do miocárdio, da hipertensão arterial sistêmica, do

diabetes mellitus, entre outras disfunções, com tratamento associado ou não, podem ser avaliados ao longo de períodos pré-estabelecidos através desta técnica. No presente estudo, buscamos a avaliação da morfometria e função cardíacas pelo ecocardiograma, bem como a avaliação das alterações funcionais do VE por este reconhecido método não invasivo e pela medida invasiva da pressão intra-ventricular.

A indução do infarto do miocárdio (IM) experimental, por ligadura coronariana, foi utilizada no presente estudo, pois, está bem estabelecido na literatura que este procedimento provoca isquemia miocárdica e inicia um processo de disfunção e remodelamento do VE, além de induzir a formação de vasos colaterais no coração (Pfeffer et al., 1991; Banai et al., 1994ab; Elsner & Riegger, 1995; Unger, 2001). Devido a sua relevância clínica e a uma relativa facilidade metodológica, a insuficiência cardíaca induzida pelo IM é um dos modelos mais utilizados nos trabalhos com animais de pequeno porte (Elser & Riegger, 1995). Entretanto, as desvantagens de utilizar esse procedimento experimental incluem a necessidade de toracotomia, uma mortalidade relativamente alta durante o procedimento cirúrgico e nas primeiras horas pós IM (~ 30% neste estudo), e a indução, em muitos casos, de uma IC moderada.

Na literatura, o IM é caracterizado de acordo com seu tamanho: inferiores a 20% do VE – pequenos; de 20-39% - moderados; maiores que 40% - grandes (Pfeffer et al., 1979, Pfeffer et al., 1991). No presente estudo a área do infarto, avaliada pelas áreas ascínéticas e discinéticas da parede do VE, foi em torno de ~ 40% da parede do VE na avaliação inicial nos grupos infartados (I e DI). Vale destacar que Moises et al. (2000) e Nozawa et al. (2006) demonstraram que a avaliação da área de infarto pelo ecocardiograma é uma medida 100% sensível e que se correlaciona com as avaliações

anatomo-patológicas (histologia). Ao final do protocolo, os animais I apresentaram maior área de infarto em relação à sua avaliação inicial, alteração esta não observada nos animais DI, sugerindo, desta forma, que a pré-existência de DM possa influir na progressão da área de lesão após um evento isquêmico.

A perda, em torno de 40%, da massa de miócitos do ventrículo esquerdo após um evento isquêmico (Anversa et al., 1985a, Pfeffer et al., 1991, Stefanon et al., 1994) está associada à hipotensão, redução da fração de ejeção e do débito cardíaco após o IM (De Angelis et al., 2001). Em resposta a estas alterações hemodinâmicas, a massa ventricular remanescente se hipertrofia (Anversa et al. 1985b, Meggs et al., 1993). A caracterização não invasiva dos diferentes padrões geométricos e funcionais do VE, observados na hipertrofia do miocárdio, pode ser feita através do ecocardiograma. A associação dos estudos ecocardiográficos aos celulares e moleculares tem permitido o melhor entendimento do processo patológico de hipertrofia do ventrículo esquerdo em ratos (Kagaya et al., 1996).

Liu et al. (1997) demonstraram peso corporal, peso cardíaco e a razão peso do coração/peso corporal semelhantes entre ratos infartados e controles até 2 semanas após o IM. De fato, no presente estudo, não encontramos diferenças na massa do VE (MVE) dos animais infartados (I e DI), na avaliação inicial, quando comparados com seus respectivos controles (C e D). Todavia, Liu et al. (1997) observaram aumento da massa cardíaca e de sua razão pelo peso corporal de 1 até 6 meses após o IM. Em nosso estudo, observamos aumento da MVE absoluta no final do protocolo (90 dias pós IM) nos animais infartados (I e DI) quando comparados à suas avaliações iniciais (2 dias pós

IM). Todavia, quando a MVE foi corrigida pelo peso corporal, observamos estas alterações somente no grupo I em relação à sua avaliação inicial, não sendo o mesmo comportamento observado para o grupo DI.

Em relação ao outro parâmetro morfométrico avaliado, a VEDIA mostrou-se aumentada nos grupos infartados (I e DI) em relação aos grupos não infartados (C e D), indicando uma dilatação do VE pós-evento isquêmico. Além disto, as avaliações nos grupos infartados da área do VE e do eixo maior do VE pelo modo M, ambos em diástole, forneceram importantes informações no presente estudo. A vantagem destas duas últimas avaliações consiste no fato de que a visualização do VE pelo modo M permite o delineamento total da cavidade ventricular na diástole, a partir da qual o equipamento calcula a área do VE e o maior eixo longitudinal, enquanto que a medida da VEDIA é realizada a partir da observação de uma região da cavidade do VE (região medial), podendo, portanto, ser influenciada pela localização do IM. Dessa forma, em corações infartados as avaliações da área e do eixo longitudinal do VE parecem ser mais precisas. Neste aspecto, é importante ressaltar que os animais I apresentaram aumento destas duas medidas do VE ao final do protocolo (90 dias) quando comparados com as suas avaliações iniciais (2 dias). Entretanto, tais alterações não foram observadas no grupo DI, sugerindo que os animais diabéticos infartados apresentem menor dilatação da cavidade ventricular.

A manutenção da massa, da área e do eixo maior do VE no grupo diabético/infartado pode estar associada à redução da PA, FC (De Angelis et al., 2002), da fração de ejeção (Wichi et al., 2007) e conseqüentemente do débito cardíaco

observados neste modelo experimental de diabetes por STZ e também no presente estudo, gerando um menor estresse cardiovascular e menor sobrecarga de volume. Além disso, o fato da área de infarto não ter se alterado em relação à avaliação inicial no grupo DI poderia ter colaborado para um menor remodelamento ventricular neste grupo.

Apesar da hipertrofia cardíaca compensar o déficit provocado pela morte dos miócitos decorrente do IM na fase inicial deste processo (aproximadamente até duas semanas pós-infarto), cronicamente a hipertrofia ventricular esquerda não resulta em melhora da função sistólica do VE, avaliada em corações isolados por Mill et al. (1990) e pelo método de angiografia direta (para avaliar a função do VE em ratos anestesiados) por Liu et al. (1997). Todavia, a função do ventrículo infartado não depende só do tamanho e da localização do IM (Corr et al., 1976; Mathey et al., 1974), mas também das alterações envolvidas na complacência ventricular, influências neurohumorais, resistência vascular sistêmica e complacência venosa, além da progressão e extensão da hipertrofia no miocárdio não infartado (Pfeffer et al., 1979).

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., 2000b; 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., 2000b; 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. No presente estudo, utilizamos avaliações invasivas e não invasivas da função ventricular no animal *in vivo* e demonstramos

disfunções sistólica (menor FE, VEC, PSVE e  $+dP/dt$ ) e diastólica (maior TDE, TRIV e menor  $-dP/dt$ ) nos animais do grupo D em relação a suas avaliações iniciais (para alguns dos parâmetros ecocardiográficos) ou em comparação aos animais do grupo C (para a VEC, TDE, TRIV e avaliações intra-ventriculares). Joffe et al. (1999) mostraram *in vivo* reduzidos picos de pressão sistólica ventricular e aumento na PDF, bem como atenuação das derivadas de contração ( $+dP/dt$ ) e relaxamento ( $-dP/dt$ ) em ratos com 75 dias de diabetes. Em nosso laboratório, corações isolados de ratos com 11 semanas de diabetes não apresentaram diferenças na PSVE, mas mostraram reduzida contratilidade quando comparados com o grupo controle (De Angelis et al., 2000b). Vale destacar, que neste último estudo realizado por nosso grupo, o treinamento físico foi eficaz em reverter a disfunção ventricular dos animais diabéticos. Akula et al. (2003) em um estudo recente concluíram que 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, avaliadas tanto pelo ecocardiograma quanto pela canulação do VE (Wichi et al., 2007).

No presente estudo a função sistólica mostrou-se reduzida nos animais infartados (I e DI) quando comparados aos animais não infartados (C e D). Nas avaliações ecocardiográficas, foi observada redução da VEC (em relação ao C, somente) e da FE nos grupos infartados em relação aos grupos não infartados (C e D), tanto na avaliação



inicial quanto no final do protocolo experimental. É importante destacar que o grupo DI apresentou uma atenuação da disfunção sistólica, uma vez que nas avaliações ecocardiográficas finais este grupo mostrou maiores valores de VEC e FE em relação ao grupo I isoladamente. Os valores de FE (40-50%) observados nos grupos infartados podem indicar um déficit moderado do VE, conforme Campos Filho et al. (2005). Além disso, é importante lembrar que todos os pacientes portadores de FE inferior a 50% são considerados portadores de disfunção sistólica (Simões et al., 2005). Indivíduos nestas condições apresentam grande predisposição para evolução ao quadro de insuficiência cardíaca (IC), sendo esta uma síndrome clínica de alta incidência, caracterizada por intolerância ao esforço físico, fadiga associada ou não a edema e dispnéia (Roveda et al., 2005).

As avaliações diretas da função sistólica ventricular confirmam as evidências ecocardiográficas através da demonstração da reduzida PSVE e  $+dP/dt$  nos grupos experimentais em relação ao C. É importante salientar que os animais DI apresentaram aqui o mesmo comportamento observado nas avaliações ecocardiográficas, ou seja, sua função sistólica (representada pela  $+dP/dt$  – inotropismo) estava mais preservada quando comparados com os animais I. No entanto, a disfunção sistólica presente nos grupos experimentais no período basal não foi agravada durante o período de sobrecarga de volume, ou mesmo na recuperação deste procedimento. Vale ressaltar que as medidas não invasivas, indicativas de função sistólica, apresentaram uma correlação positiva ( $r=0,82$ ;  $p<0,0005$ ), mais especificamente entre a derivada de contração do VE ( $+dP/dt$ ) e a fração de ejeção (FE) nos grupos avaliados.

Os parâmetros de função diastólica (TRIV e TDE) se mostraram reduzidos nas avaliações ecocardiográficas dos grupos infartados (I e DI) em relação ao grupo C. Além disso, é interessante chamar a atenção para o fato de que a associação entre diabetes e infarto não induziu prejuízo adicional da função diastólica destes animais.

Além disso, a medida da pressão ventricular de forma direta também demonstrou disfunção diastólica (maior PDF e prejuízo na  $-dP/dt$ ) nos grupo infartados (I e DI) em relação aos grupos C e D (somente a PDF). Ao contrário dos demais parâmetros hemodinâmicos sistêmicos, o aumento da PDF parece ser um achado comum na literatura (Liu et al., 1997; De Felice et al., 1989; Pfeffer et al., 1990; Stefanon et al., 1994). Estudos que acompanharam o curso das alterações hemodinâmicas em ratos, de 1 semana até 35 semanas (Liu et al., 1997; De Felice et al., 1989) após o IM, demonstraram valores de PDF elevados já na primeira semana de IM e se mantêm até a 35ª semana. O aumento da PDF reflete não só uma disfunção da PSVE, devido à perda de massa ventricular em função do IM, mas também um prejuízo no relaxamento cardíaco, demonstrado pela redução na  $-dP/dt$ . Esta disfunção diastólica é difícil de ser quantificada, mas exerce efeitos adversos na perfusão subendocárdica o que leva a uma progressiva disfunção sistólica (Cohn, 1989).

O relaxamento cardíaco (inativação da contração) é um processo dinâmico que se inicia no final da contração e ocorre durante a fase de relaxamento isovolumétrico e início do enchimento ventricular. De fato, cerca de um terço dos pacientes com insuficiência cardíaca apresentam disfunção diastólica dominante, e isto pode estar relacionado à recaptção de  $Ca^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático e pelo efluxo de  $Ca^{2+}$

pelo miócito, além de um aumento agudo na pós-carga ventricular podem tornar lento o relaxamento miocárdico (Colucci & Braunwald, 2003).

Um achado muito importante deste estudo foi a maior PDF nos animais I em relação aos animais DI no estado basal e no período de recuperação da sobrecarga de volume. Além disto, cabe lembrar que a  $-dP/dt$  (lusitropismo) do grupo I foi diferente do grupo C na recuperação da sobrecarga de volume, fato que não foi observado no grupo DI. Sugerindo, desta forma, que este último grupo apresente melhor desempenho ventricular frente à sobrecarga fisiológica. Vale destacar que se observou uma correlação positiva ( $r=0,81$ ;  $p<0,0005$ ) entre a derivada de relaxamento do VE ( $-dP/dt$ ) e a cavidade do VE em diástole (VEDIA) nos grupos avaliados (Figura 16), mostrando que o grau de disfunção do relaxamento do VE pode estar relacionado ao remodelamento cardíaco.

No presente estudo, as medidas direta e indireta da função ventricular demonstram disfunção sistólica e diastólica nos grupos infartados em relação aos ratos controles. Todavia, em vários parâmetros avaliados estas disfunções mostraram-se mais acentuadas no grupo I em relação ao DI. Estes achados, somados ao aumento do índice de desempenho miocárdico (IDM - um índice que combina função sistólica e diastólica e é independente da FC, portanto não exige normalização) (Salemi et al., 2004), no grupo I em relação ao DI, indicam associação de alterações no IDM com variáveis de função sistólica e diastólica ventriculares, conforme previamente demonstrado em humanos (Tei et al., 1997), camundongos (Broberg et al., 2003) e ratos submetidos ao IM (Jegger et al., 2006)). Recentemente, em estudos clínicos, o IDM tem sido descrito como um

bom preditor de mortalidade cardiovascular independente de outras medidas de função cardiovascular e de clássicos fatores de risco (fumo, hipertensão, diabetes, etc) em homens idosos (Arnlov et al., 2005).

### 5.3.2. Expressão de proteínas relacionadas à homeostase do $Ca^{2+}$ intracelular

Com o objetivo de buscar uma possível explicação para o achado de que os animais diabéticos, após 90 dias de IM, apresentaram atenuada disfunção sistólica (FE, VEC, +dP/dt) e função global (IDM) em relação aos animais infartados isoladamente, avaliamos a expressão de proteínas cardíacas envolvidas na regulação de  $Ca^{2+}$  intracelular.

O RS desempenha um papel central na regulação dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular e desse modo controla a contração e o relaxamento cardíaco (Eisner et al., 2000). Nesse aspecto, dependendo da espécie estudada, a SERCA2 é responsável por 75-92% da recaptação de cálcio intracelular resultando no relaxamento cardíaco e, conseqüentemente, armazenando cálcio viável para a próxima onda de contração ventricular (Bassani et al., 1994). O  $Ca^{2+}$  que não é recaptado para o interior do RS é extruído da célula por meio da SERCA2 e pelo trocador  $Na^+ / Ca^{2+}$ , sendo este último considerado o mecanismo dominante de efluxo de  $Ca^{2+}$  do miócito cardíaco (Bassani et al., 1994).

Complexas relações entre anormalidades metabólicas que acompanham o diabetes e suas conseqüências moleculares alteram a estrutura e a função ventricular

(Poornima et al., 2006). Estudos têm demonstrado redução da expressão e atividade da SERCA2 (Vasanji et al., 2004; Netticadan et al., 2001) e NCX (Chattou et al., 1999) em animais diabéticos por STZ, levando ao prejuízo da homeostasia do cálcio intracelular e, conseqüentemente, levando à cardiomiopatia diabética nestes animais. No presente estudo, não encontramos diferenças significativas na expressão de SERCA2 e NCX, embora seja observada uma forte tendência de aumento do NCX ( $p=0,065$ ) nos animais diabéticos quando comparados com os animais controles. Os nossos dados corroboram dados de outros autores que não encontraram diferenças na expressão gênica e proteica de SERCA2 (Zarain-Herzberg et al., 1994) (3 a 5 semanas) e expressão gênica do NCX (Hattori et al., 2000) (5 semanas) em ratos diabéticos por STZ .

A cardiomiopatia diabética tem sido extensivamente estudada tanto clinicamente (Regan et al., 1994) quanto experimentalmente (Wichi et al., 2007). Além da redução da SERCA2 e aumento do NCX nos corações diabéticos, o PLN, um importante indicador de recaptção de  $Ca^{2+}$  pelo RS e da função cardíaca, parece desempenhar um papel importante na disfunção ventricular em modelos experimentais, uma vez que em sua forma defosforilada, diminui a afinidade da SERCA2 ao  $Ca^{2+}$ . Em estudo experimental, Vasanji et al. (2004) evidenciaram um aumento na expressão de PLN e redução na expressão dos seus sítios de fosforilação, serina 16 e na treonina 17, em ratos diabéticos por STZ com 6 semanas. Além disso, os autores demonstraram que estas alterações foram paralelas à redução da função ventricular, observada pela redução das derivadas de contração (+dP/dt) e relaxamento cardíaco (-dP/dt). De fato, muitos autores têm associado o desenvolvimento da cardiomiopatia diabética com o aumento da ação do PLN, inibindo a afinidade da SERCA2 ao  $Ca^{2+}$  e reduzida fosforilação do PLN, via PKA

e CAMKII, tanto *in vivo* (4-6 semanas de diabetes por STZ) (Zhong et al., 2001) quanto em miócitos de ratos diabéticos (Choi et al., 2002).

Contrariamente aos dados supra citados, em relação à SERCA2 e o NCX, não observamos diferenças significativas na expressão de PLN e PLN fosforilado na serina 16 e treonina 17, em relação aos animais controle. Além disso, também não observamos alterações na expressão da proteína fosfatase 1 (PP1) nestes animais, indicando que sua ação de inibir a defosforilação do PLN estava normal. Outros pesquisadores não observaram alterações na expressão dessas proteínas tanto em ratos resistentes à insulina quanto em diabéticos induzidos por STZ (Teshima et al., 2000; Wold et al., 2005).

Embora não tenhamos observado nos animais diabéticos diferenças na expressão dessas proteínas cardíacas envolvidas na regulação intracelular de  $Ca^{2+}$ , um estudo mais detalhado dessas proteínas, bem como o transiente de  $Ca^{2+}$  nos corações dos animais diabéticos, seriam de grande relevância no entendimento da disfunção cardíaca observada nesses animais.

A IC, freqüentemente desenvolvida após o IM, leva a um aumento da modulação simpática e, à perda de músculo cardíaco diminuindo a capacidade da bomba cardiovascular e promovendo alterações moleculares no miocárdio remanescente (Bers, 2002). Em muitos estudos, a regulação defeituosa do ciclo de  $Ca^{2+}$  é o maior determinante da progressão da disfunção ventricular e de arritmias fatais (Chien, 1999; Wehrens et al., 2004). Um fator central que limita a amplitude dos transientes de  $Ca^{2+}$  na IC é a diminuição na expressão proteica de SERCA2. Na IC, dados experimentais dão suporte tanto a diminuição da recaptção de  $Ca^{2+}$  pela SERCA2 (Wisloff et al., 2002) quanto o vazamento pelo RYR (Ai et al., 2005; Reiken et al., 2003). Além disso, o fluxo

transsarcolemal de  $\text{Ca}^{2+}$  também afeta o conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, já que tem sido observado aumento na expressão proteica e na função do NCX e redução na entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  via canal para  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependente (Hasenfuss et al., 1999).

Embora não tenhamos encontrado diferenças significantes, observamos uma forte tendência na redução da expressão de SERCA2 nos grupos infartados (I e DI) em relação aos não infartados (C e D) (I vs. C:  $p=0,059$ ; vs. D:  $p=0,055$ ; DI vs. C:  $p=0,075$  e DI vs. D:  $p=0,071$ ). A diminuição da expressão de SERCA2 pode ser um marcador molecular da transição da hipertrofia cardíaca compensada para descompensada com progressão da doença e evolução para IC (Feldman, 1993).

Além disso, vale destacar que a diminuição na expressão de SERCA2 é um achado comum em corações insuficientes (Hasenfuss et al., 1999; Jiang et al., 2002; Schillinger et al., 2006; Wisloff et al., 2002) e está ligada à diminuição da concentração pico de  $\text{Ca}^{2+}$  durante a sístole, já que diminui o conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS. De fato, obtivemos uma correlação positiva entre a expressão de SERCA2 e fração de ejeção ( $r=0,85$ ;  $p<0,001$ ) e a  $+dP/dt$  ( $r=0,87$ ;  $p<0,001$ ), sugerindo que, mesmo sem diferença estatística, menor expressão de SERCA2 estava relacionada a disfunção sistólica nos animais estudados.

Além da SERCA2, o NCX também é um mecanismo de diminuição da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, e, por isso, a razão SERCA2/NCX reflete o balanço entre a recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  via SERCA2 e a extrusão via NCX. Assim, em nosso estudo não observamos diferenças significativas na expressão do NCX nos animais infartados em relação ao controle, embora com tendência ao aumento ( $p=0,059$ ) e,

surpreendentemente, encontramos redução na expressão dessa proteína nos animais DI quando comparados com os animais somente diabéticos ou infartados. Existem muitas divergências na literatura com relação à expressão de NCX na IC. Alguns trabalhos têm demonstrado que a expressão deste trocador está aumentada tanto em animais experimentais (Hatem et al., 1994; Lu et al., 2002; Studer et al., 1997), como em humanos (Studer et al., 1994), o que colaboraria para a diminuição do conteúdo sarcoplasmático de  $Ca^{2+}$ , e conseqüentemente, prejudicaria a função sistólica. Por outro lado, outros trabalhos não têm observado alterações (Hasenfuss et al., 1999), ou mesmo verificaram diminuição na expressão deste trocador (Yao et al., 1998). Essas divergências entre os estudos podem ser explicadas pela utilização de diferentes protocolos, modelos experimentais de insuficiência cardíaca, etiologia e espécies estudadas.

A redução na expressão do NCX observada no grupo DI parece ser um mecanismo compensatório para a tendência de redução da expressão de SERCA2 nesse grupo, e pode estar associada à atenuada disfunção sistólica nesse período de observação. De fato, o aumento da razão SERCA2/NCX nesse grupo sugere que, nesta fase, ele pode estar contribuindo para evitar a perda significativa de  $Ca^{2+}$  para o meio extracelular, apesar de tendência a redução de SERCA2.

Uma outra proteína que exerce um papel importante na regulação da função cardíaca é o PLN e seus sítios de fosforilação são mediadores na contração e no relaxamento do miocárdio (Luo et al., 1994). A expressão de PLN total não diferiu entre o grupo I e o grupo C, porém observamos uma redução significativa no grupo DI em



relação aos grupos C, D e I. Os resultados na literatura referentes à expressão de PLN em corações insuficientes ainda são divergentes. Jiang et al. (2002) encontraram diminuição na expressão de PLN em um modelo de IC em cães, porém não encontraram alteração na expressão dessa proteína em pacientes com IC. De fato, a não alteração da expressão de PLN no grupo I, em nosso estudo, corrobora os dados de Daniels et al. (2007), no qual os autores demonstraram que a expressão de PLN não foi alterada em 12 e 28 semanas pós-IM em ratos. Todavia, o que mais nos surpreendeu foi o fato dos animais DI terem reduzida expressão desta proteína em relação aos outros grupos experimentais. Uma vez que estes animais possuem reduzida expressão de PLN, há também uma redução na inibição da SERCA2 pelo PLN, possibilitando a SERCA2 recaptar mais  $Ca^{+2}$  para dentro do RS. Dessa forma, esta pode ser uma possível explicação para o fato dos animais DI apresentarem melhor função sistólica em relação aos animais I. Em analogia ao observado em camundongos geneticamente modificados para a ablação do PLN, Chu & Kranias (2006) observaram uma diminuição do remodelamento cardíaco e melhora da função miocárdica em modelo de IC crônica.

Na IC observa-se uma hipofosforilação do PLN na Serina 16 associada à disfunção ventricular (Hajjar et al., 1998). Em estudo recente, Yamada et al. (2006) demonstraram que a hipofosforilação do PLN na Serina 16 ocorreu num modelo genético de IC só após a décima semana de vida, demonstrando que essa hipofosforilação está associada ao tempo da IC. No mesmo trabalho, Yamada et al. (2006) demonstraram que a fosforilação do PLN na Treonina 17 não foi diferente dos grupos controle (em 6, 10 e 28 semanas).

No presente estudo, observamos que o PLN fosforilado tanto na serina 16 quanto na treonina 17 não estavam alterados no grupo I em relação ao grupo C. Ainda é contraditória a informação acerca da fosforilação do PLN em seus dois sítios de fosforilação na IC. De fato, outros autores não têm encontrado alterações na fosforilação tanto da serina 16 em camundongos transgênicos com IC (Netticadan et al., 2000), quanto na treonina 17 em corações insuficientes de humanos (Brixius et al., 2003). Todavia, os animais DI apresentaram hiperfosforilação nestes dois sítios de fosforilação do PLN em relação aos animais C, D e I. Este achado sugere uma resposta compensatória adicional à tendência de diminuição de SERCA2, que parece colaborar com a redução na expressão de NCX e PLN no grupo DI, contribuindo para a recaptação de cálcio citosólico para o RS.

É importante salientar que a fosforilação do PLN na Treonina 17 é diretamente proporcional ao aumento da frequência de estimulação (Hagemann et al., 2000) e nível de estimulação  $\beta$ -adrenérgica (Said et al., 2002). Dessa forma, observação de aumento na expressão proteica de PLN na treonina 17 nos animais DI, pode estar associada a maior modulação simpática avaliada pela queda acentuada da banda baixa frequência do intervalo de pulso (análise espectral). Um aspecto interessante é que a hiperfosforilação do PLN na treonina 17 associa-se a mecanismos de compensação, já que Mattiazzi et al. (2005) observaram que esta hiperfosforilação é transitória e normalmente encontrada em períodos de acidose e reperfusão.

A amplitude e a velocidade do ciclo do  $Ca^{2+}$  nos cardiomiócitos são reguladas pelo balanço da fosforilação e defosforilação por meio de quinases e fosfatases, em

resposta a uma variedade de estímulos extrínsecos. As proteínas fosfatases 1 e 2A (PP1 e PP2A) são as responsáveis por contrabalançar a fosforilação de diversas proteínas, dentre elas o PLN (Neumann et al., 1993).

A fim de verificar o possível mecanismo responsável pela hiperfosforilação do PLN na serina 16 e treonina 17 no grupo DI, realizamos o estudo da PP1 nos grupos experimentais. A PP1 é o maior subtipo de serina/treonina proteína fosfatase nos cardiomiócitos (Neumann et al., 1993). Vários trabalhos têm mostrado que ela está hiperativada no citosol em preparações de corações com disfunção (Boknik et al., 2000; Gupta et al., 2003; Huang et al., 1999; Neumann et al., 1997). Além disso, Ai et al. (2005) demonstraram que a expressão total de PP1 estava aumentada em coelhos com insuficiência aórtica quando comparados aos coelhos controles. Todavia, alguns trabalhos na literatura têm encontrado diminuição na expressão das fosfatases na IC (Lokuta et al., 1995; Marks, 2001). No presente estudo, não foram observadas alterações na expressão desta proteína nos animais I em relação aos animais controles. Contudo, notamos uma redução significativa na expressão de PP1 no grupo DI, possivelmente explicando o achado da hiperfosforilação do PLN na serina 16 e treonina 17. No entanto, esses resultados ainda são controversos.

#### ***5.4. Avaliações da função autonômica***

A neuropatia autonômica é uma complicação freqüente do diabetes mellitus e está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade em pacientes sintomáticos (Ewing et al., 1980). Em indivíduos diabéticos, a VFC pode preceder sintomas clínicos de disfunção autonômica (Task Force, 1996). Estudos de nosso laboratório têm mostrado redução na sensibilidade barorreflexa, tônus cardíaco vagal e VFC em animais diabéticos por STZ (De Angelis et al., 2002; Schaan et al., 2004). Além disso, La Rovere et al. (1998) demonstraram que redução da sensibilidade barorreflexa, bem como da VFC estavam relacionadas com aumento nas taxas de mortalidade em pacientes após o IM. Cientes da importância clínica da disfunção autonômica presente tanto no diabetes quanto em indivíduos pós infarto do miocárdio, avaliamos a sensibilidade barorreflexa e variabilidades da FC e PAS nos animais diabéticos, infartados e diabéticos/infartados.

O controle barorreflexo da circulação é um dos mais importantes mecanismos de controle momento a momento da pressão arterial. De fato, o controle da VPAS pelo barorreflexo é a chave para a homeostase fisiológica. Isso é demonstrado clinicamente em estudos que mostraram que o prejuízo da função barorreflexa é um fator de risco independente para morte súbita em pacientes pós IM (La Rovere et al., 1998). Além disso, pacientes diabéticos com reflexos cardiovasculares normais têm menor mortalidade quando comparados àqueles que apresentam algum tipo de prejuízo na função reflexa autonômica (Ewing et al., 1980).

No presente estudo, animais diabéticos por STZ (D e DI) mostraram redução da sensibilidade dos reflexos comandados pelos pressorreceptores (resposta bradicárdica) em relação aos animais não diabéticos (C e I), além de reduzida resposta taquicárdica em comparação ao grupo C. Esses dados são confirmatórios, uma vez que já existem demonstrações de que 5 dias de diabetes por STZ leva o prejuízo no controle barorreflexo da FC em ratos caracterizado pela redução de resposta de taquicardia, sem alteração de bradicardia, numa fase tão precoce da doença (Maeda et al., 1995a). Quinze e 30 dias após administração de STZ, entretanto, observou-se também redução de bradicardia nesses animais (Dall'Ago et al., 1997), mudanças essas que persistiram até 80 dias depois da injeção de STZ (De Angelis et al., 2002; Harthmann et al., 2007).

O prejuízo da habilidade para adequadamente regular a FC durante mudanças na PA têm sido atribuído a algumas alterações na atividade cardíaca parassimpática (Maeda et al., 1995a, De Angelis et al., 2000b), entretanto, mudanças na função dos receptores atriais muscarínicos (Carrier & Aronstam, 1987) ou na mediação central do reflexo barorreceptor não podem ser excluídas (Fazan et al., 1995; Dall'Ago et al., 2007).

Um estudo do nosso laboratório demonstrou que não é o ramo eferente do reflexo comandado pelos pressorreceptores o principal responsável pela disfunção barorreflexa observada no diabetes por STZ em curto prazo (10-20 dias), já que observamos que mesmo em presença de respostas reflexas reduzidas nos diabéticos as respostas bradicárdicas são similarmente maiores quando produzidas pela estimulação direta do nervo vago ou por injeções de metacolina em ratos (Dall'Ago et al., 2002). O aumento da bradicardia induzido pela injeção de metacolina poderia representar hipersensibilidade de receptores muscarínicos caracteristicamente observada em

presença de redução da atividade parassimpática, como demonstrada em ratos diabéticos (STZ). Isso indicaria, portanto, que o sistema nervoso central deve ser o sítio da alteração no barorreflexo, uma vez que, não se observaram alterações funcionais de aferência desses barorreceptores em ratos diabéticos por STZ (Dall'Ago et al. 2002).

Em um estudo acompanhando pacientes após o IM, a descarga simpática estava aumentada em poucos dias após o evento isquêmico (2-4 dias) e mantida elevada após 3 a 6 meses (Graham et al., 2002). Além disso, a IC induzida em ratos foi caracterizada por um aumento em diversos fatores como atividade de renina plasmática, arginina vasopressina e fator natriurético atrial na fase aguda e na fase crônica, com conseqüente aumento da atividade nervosa simpática (Francis et al., 2001). A hiperatividade simpática, além de estar ligada à morbidade e mortalidade (Francis et al., 1989), também induz a disfunção barorreflexa em indivíduos com IC (Eckberg et al., 1971).

De fato, nos animais do grupo I também observamos diminuição das respostas bradicárdica e taquicárdica a alterações de PA em relação ao grupo C, sendo que os animais DI apresentaram menor resposta taquicárdica quando comparado não só ao C, mas também ao grupo I. Lacerda (2000) não observou diferença para os índices de bradicardia e taquicardia reflexa em ratos após 1 e 10 dias de IM quando comparados ao grupo controle. Porém, Kruger et al. (1997) relataram diferenças na bradicardia reflexa em 3 e 28 dias após o IM quando comparados com os grupos controles (Sham).

A redução da sensibilidade barorreflexa encontrada nos animais infartados, mas, principalmente nos animais DI pode ser associada a neuropatia autonômica diabética somada a hiperatividade simpática, comumente observada nos modelos crônicos de IC.

Cabe ressaltar que em um estudo com ratos infartados, a simpatectomia crônica foi eficaz em prevenir a disfunção barorreflexa nestes animais (Mircoli et al., 2002).

Além da sensibilidade barorreflexa, a VFC e VPAS têm se tornado importantes ferramentas para o diagnóstico e prognóstico em muitas patologias, dentre elas o diabetes e a IC (Gottsäter et al., 2006; La Rovere et al., 1998).

Em virtude da neuropatia autonômica, pacientes com diabetes mellitus normalmente apresentam uma reduzida habilidade de regular a FC, atribuída não só a dessensibilização barorreflexa, mas também disfunção parassimpática cardíaca e/ou central. As injúrias causadas pelo diabetes 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).

Na literatura parece haver um consenso no que diz respeito à redução da VFC no diabetes, demonstrada tanto em humanos (Gottsäter et al., 2006), ratos STZ (Fazan et al., 1997; Fazan et al., 1999) e outros modelos animais de diabetes (Mésangeau et al., 2000), sendo que esta redução pode estar associada à duração e a gravidade do diabetes. De fato, em nosso estudo observamos uma redução da VFC no grupo diabético, avaliado tanto pela variância total, quanto pela média dos desvios padrões do intervalo de pulso. Provavelmente, essa redução possa ser explicada pela redução do tônus vagal e manutenção do tônus simpático observados neste modelo de diabetes (De Angelis et al., 2000b). Recentemente, em nosso laboratório, ratas diabéticas submetidas à ooforectomia bilateral apresentavam uma redução da VFC e da sensibilidade barorreflexa quando

comparadas aos controles. No entanto, o treinamento físico foi eficaz em aumentar a VFC e a sensibilidade barorreflexa, bem como em reduzir a mortalidade neste modelo (Souza et al., 2007). No presente estudo, não observamos mudanças na VPAS no grupo diabético em relação controle. A redução da VFC nos animais diabéticos corrobora os achados de Fazan et al. (1999), mostrando quedas mais acentuadas na VFC de acordo com o tempo de indução do diabetes por STZ. Adicionalmente, os autores observaram também uma queda da VPAS somente nos animais diabéticos de 10 dias a 18 semanas de indução do diabetes, não sendo observado estas diferenças na fase aguda (5dias).

Em relação aos animais infartados (grupos I e DI), observamos redução da VFC evidenciadas pelo SDNN e pela variância total do intervalo de pulso em relação aos animais controle. Todavia, o grupo DI apresentou uma redução mais acentuada do SDNN quando comparado ao grupo I. De fato, muitos estudos da literatura mostram uma severa redução da VFC em pacientes após evento isquêmico ou mesmo em indivíduos com IC já estabelecida. Além disso, estes estudos relacionam a redução da VFC a um aumento nas taxas de mortalidade destes indivíduos insuficientes (Guzzetti et al., 2002; La Rovere et al., 2003; Ponikowsky et al., 1997).

A redução mais acentuada da VFC observada na associação do diabetes e infarto do miocárdio provavelmente coloca estes indivíduos numa situação de maior risco. De fato, a associação da neuropatia autonômica do diabetes (com redução do tônus vagal) com o conjunto de anormalidades encontradas na IC (redução da atividade vagal acompanhada de aumento da atividade simpática) (La Rovere et al., 1998), possivelmente reduz a capacidade destes animais de controlar adequadamente variações



circadianas da PA e FC. Adicionalmente, neste estudo, encontramos aumento da VPAS (variância) nos animais infartados isoladamente quando comparados aos animais C, D e DI. Estudos da literatura com animais hipertensos (SHR), com ou sem denervação sino-aórtica, observaram uma correlação direta entre o aumento da VPAS com aumento de lesões de órgãos alvo, independente dos níveis de pressão arterial (Miao & Su, 2002). Estes dados sugerem que a maior VPAS no grupo I possa contribuir para o comprometimento de diferentes órgãos, tal como o coração, onde se observa frequentemente a hipertrofia cardíaca.

Em indivíduos saudáveis, situações de aumento da atividade simpática normalmente vêm acompanhadas de aumento da banda de LF (Task Force, 1996). Por outro lado, o aumento da atividade simpática em pacientes com doença cardiovascular pode ser acompanhado de aumento (Lombardi et al., 1996), diminuição (Guzzetti et al., 1995) ou mesmo nenhuma alteração (Bigger et al., 1995) da banda de LF. Estudos com indivíduos diabéticos têm demonstrado uma significativa redução da VFC, principalmente relacionada à redução dos dois componentes oscilatórios, LF e HF, mesmo na ausência de outras manifestações nos parâmetros cardiovasculares (Fazan et al., 1999).

Neste estudo constatamos, principalmente, redução da banda de LF do IP nos animais diabéticos (D e DI) em relação aos animais não diabéticos (C e I). Na literatura é bastante comum encontrarmos redução dos componentes oscilatórios (bandas de LF e HF) da PA e FC em pacientes diabéticos (Gottsäter et al., 2006; Yamamoto et al., 1999). Em um estudo utilizando indivíduos diabéticos com neuropatia periférica, Yamamoto et

al. (1999) evidenciaram significativa redução das bandas de LF e HF da VFC quando comparados com indivíduos não diabéticos pareados por idade. Além disso, os autores constataram, neste estudo, que os principais fatores relacionados à queda da banda de LF eram a duração do diabetes bem como a elevação de dos níveis de hemoglobina glicosilada nestes pacientes. É interessante notar que, essas alterações, por sua vez, estão correlacionadas negativamente com os níveis de glicose plasmática, sugerindo que o aumento dos níveis glicêmicos esteja associado ao prejuízo da função autonômica para o coração nesse modelo (Fazan et al., 1999; Schaan et al., 2004). 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).

Adicionalmente, a banda de LF da PAS mostrou-se reduzida somente nos animais DI em relação aos controles. A banda de LF da PA resulta de vários fatores neuro-humorais e funcionais, porém a maior influência deste componente é a modulação simpática (Guzzetti et al., 2002). No presente estudo, a redução das bandas de HF e LF do IP nos animais D e DI em relação aos animais C e I, bem como a redução da banda de LF da VPAS encontrada nos animais DI quando comparados aos animais I, corroboram os dados de Fazan et al. (1999) que mostraram uma redução dos componentes LF e HF (VFC e VPAS) nos animais diabéticos em relação aos controles. Dessa forma, a observação de redução das bandas de LF e HF da VFC nos grupos diabéticos associada a redução da sensibilidade barorreflexa confirma a presença de disautonomia nos grupos diabéticos.

Em relação aos animais infartados isoladamente, observamos que as bandas de LF e HF da VFC estavam reduzidas e a banda de LF da VPAS estava aumentada neste grupo experimental em relação ao grupo controle. A redução da banda de HF da VFC, representa a diminuição da contribuição da modulação parassimpática usualmente descrita na fisiopatologia do desenvolvimento da IC. A diminuição da modulação parassimpática é um componente integral do desbalanço autonômico de um coração insuficiente e potencialmente implicado na gênese de arritmias ventriculares e morte cardíaca (Binkley et al., 1991). Em um estudo recente, os autores observaram que a banda de HF da VFC reduzia gradualmente em decorrência da evolução da IC em cães, indicando, desta forma, que este componente pode ser um bom marcador de gravidade induzida pela IC (Motte et al., 2005).

Em estudos, clínicos e experimentais com IC têm sido demonstrado que aumentos na banda de LF da VFC estão ligados ao grau de simpato-excitação, avaliado por medidas diretas da atividade nervosa simpática ou de norepinefrina plasmática (Kienzle et al., 1992; Ishise et al., 1998). Entretanto, em estágios avançados da doença o oposto também é verdadeiro, ou seja, a banda de LF da VFC chega a quase desaparecer em virtude do aumento da atividade simpática (Galinier et al., 2000; Van de Borne et al., 1997). A redução deste componente tem sido associada a prognósticos negativos em indivíduos insuficientes, visto que La Rovere et al. (2003) mostraram que reduzida banda de LF é um preditor independente de mortalidade cardiovascular nestes pacientes. Além disso, a redução deste componente espectral da VFC pode estar associada à progressiva desregulação dos receptores miocárdicos  $\beta$ -adrenérgicos (Bristow et al., 1982), uma redução do estoque de catecolamina no miocárdio (Eisenhofer et al., 1996),

prejuízo no barorreflexo (La Rovere et al., 1998) ou por alterações nas vias autonômicas centrais (Van de Borne et al., 1997)

Dessa forma, a redução da banda de LF do IP não só no grupo I isoladamente, mas, principalmente, a acentuada redução desta variável presente no grupo DI, são importantes indicativos de disfunção autonômica.

Vale destacar que a correlação obtida entre o componente LF do IP e a resposta bradicárdica a aumentos de PA no presente estudo, sugerem que animais com exacerbada modulação simpática apresentam reduzida sensibilidade barorreflexa. Esta correlação reforça ainda o paralelismo entre esses dois métodos de avaliação da função autonômica. Por fim, as correlações obtidas entre a resposta bradicárdica à aumentos de PA e o  $VO_2$  máx., bem como entre a banda de LF do IP e o  $VO_2$  máx. demonstram que animais com prejuízo nestas variáveis representativas de função autonômica apresentavam reduzida capacidade cardio-respiratória.

Dessa forma, fica clara a presença de disfunção autonômica avaliada por diferentes métodos nos grupos diabético e infartado. Além disso, observou-se que essa disfunção foi exacerbada no grupo diabético/infartado, associando-se com redução da capacidade funcional, o que poderia indicar um aumento do risco cardiovascular na coexistência de diabetes e IM.

### ***5.5 Avaliação da mortalidade***

A análise da curva de sobrevivência permite identificar que em todos os grupos experimentais a mortalidade foi maior quando comparados ao grupo controle. Além disso, os animais infartados tiveram uma menor proporção de sobrevivência quando comparados aos somente diabéticos, mesmo sendo estes valores semelhantes aos descritos previamente na literatura (Zornoff et al., 1997). Embora não tenha se observado diferenças estatísticas entre os grupos I e DI, a mortalidade foi 17% maior no grupo DI quando comparado ao I, em 90 dias de acompanhamento após a oclusão da artéria coronária. É possível que se tivéssemos aumentado nosso tempo de observação, pudéssemos encontrar diferenças mais marcantes, o que necessariamente deve ficar para ser analisado em estudos posteriores. De fato, sabe-se que o diabetes é uma importante causa de morbidade e mortalidade respondendo por mais de 20% do número total de pacientes admitidos por suspeita de IM. Além disso, o segmento a longo prazo destes pacientes tem mostrado um aumento crescente na mortalidade, principalmente por causa do segundo infarto ou IC (Malberg et al., 1988).

Entre os fatores de possível importância para o pior prognóstico entre pacientes diabéticos com infarto do miocárdio, pode-se incluir a aterosclerose coronária difusa, cardiomiopatia diabética, a neuropatia autonômica e, relacionados a todos estes, o controle metabólico (Raydén et al., 2003). Em nosso estudo, embora o infarto não estivesse associado à doença coronária, pois foi produzido pela oclusão aguda da artéria, o grupo DI claramente não teve controle metabólico (pois os animais não foram tratados com insulina) e apresentavam uma disfunção autonômica maior quando comparado aos

grupos D e I, sendo esses prováveis fatores associados com a mortalidade nos animais DI, uma vez que a função ventricular estava melhor preservada nesse grupo.

Finalmente, chama atenção que nas primeiras 24 horas e até 25 dias após a indução do infarto, a sobrevivência foi maior no grupo DI, indicando que nesse segmento de 90 dias, é possível que durante um período inicial esse grupo tenha tido algum tipo de proteção. Essa é uma questão em aberto, que precisaria ser testada em experimentos adicionais, mas que recebe o reforço da literatura (Ravingerová et al., 2003) já existente que propõe variações temporais na resistência à injúria isquêmica do coração diabético.

### ***5.6. Considerações finais***

No presente estudo testamos a hipótese de que o coração diabéticos seria mais resistente à injúria isquêmica. Para testar esta hipótese avaliamos alterações metabólicas, cardio-respiratórias, ventriculares (funcionais e moleculares) e autonômicas, bem como a mortalidade em um período de 90 dias de seguimento em ratos diabéticos, infartados e diabéticos infartados. Os resultados obtidos podem ser interpretados sob pelo menos dois pontos de vista.

Primeiramente, nossos achados evidenciam que a preexistência de diabetes atenua as clássicas alterações na função (sistólica, diastólica ou global) e estrutura ventriculares induzidas pela injúria isquêmica. Além disto, essa atenuação foi

acompanhada de respostas compensatórias ao IM nas proteínas envolvidas na homeostase do cálcio no miócito dos ratos diabéticos. Assim, sob esse ponto de vista poderíamos concluir que o coração diabético é mais resistente à injúria isquêmica.

Todavia, sob outro ponto de vista, não observamos diferenças entre os grupos somente infartado e infartado diabético ao analisarmos a mortalidade ao final do período de 90 dias de protocolo. Esses achados sugerem que mesmo em presença de uma função ventricular melhor preservada, o grupo diabético infartado apresentou uma sobrevivência 17% maior (porém não significativa) em relação ao grupo somente infartado. Se considerarmos, que a mortalidade é o desfecho final, então, poderíamos concluir que nossa hipótese não foi confirmada. Neste aspecto, vale destacar que se a função cardíaca estava menos comprometida, é possível que a exacerbada disfunção autonômica observada nos animais diabéticos infartados possa ter contribuído para a mortalidade nesses animais. De fato, estudos prévios já demonstraram o papel da disfunção barorreflexa e da redução da VFC na mortalidade de indivíduos pós IM independente da fração de ejeção (La Rovere et al., 1998).

Vale destacar que uma análise detalhada da curva de mortalidade revela que nos primeiros 25 dias de nosso estudo a mortalidade foi menor no grupo diabético infartado em relação ao grupo somente infartado. Esse achado (embora não explorado no presente estudo), somado ao fato de termos observado função cardíaca mais preservada pós IM nos ratos diabéticos sugerem que os primeiros dias pós evento isquêmico podem representar uma janela terapêutica ainda pouco estudada.

Concluindo, nossos resultados reforçam a idéia de que o miocárdio diabético é menos sensível à injúria isquêmica, e sugerem que se outros fatores de risco cardio-

metabólicos, como, por exemplo, a disfunção autonômica e o controle da glicemia, não tiverem um manejo e/ou tratamento adequado pós-IM, essa menor disfunção ventricular, não poderá reduzir a mortalidade em indivíduos diabéticos infartados. Por fim, nossas observações de menor mortalidade no grupo diabético infartado nos primeiros dias pós-IM sugerem que esta é uma janela de oportunidade na qual estudos futuros devem buscar alternativas farmacológicas ou não farmacológicas que possam modificar o prognóstico em indivíduos diabéticos infartados.



## 6. REFERÊNCIAS

Abboud FT. *Interaction of cardiovascular reflexes in circulatory control. In: Shepherd JT, Abboud FM. The Cardiovascular System. 3 ed. Bethesda; 1983, v.1, p. 675-753. American Physiological Society.*

Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM.  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  leak in heart failure. *Circ Res.* 2005; 9; 97(12): 1314-22.

Akula A, Kota MK, Gopisetty SG, Chitrapu RV, Kalagara M, Kalagara S, Veeravalli KK, Gomedhikam JP. Biochemical, histological and echocardiographic changes during experimental cardiomyopathy in STZ-induced diabetic rats. *Pharmacol Res.* 2003; 48(5): 429-35.

Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, Olivetti G. Myocardial response to infarction in the rat. II. Morphometric measurements of infarct size and myocyte cellular hypertrophy. *American Journal of Pathology.* 1985a; 118:484-492.

Anversa P, Loud AV, Levicky V, Guideri G. Left ventricular failure induced by myocardial infarction. I. Myocyte hypertrophy. *American Journal of Physiology.* 1985b; 248: H876-882.

Anwana AB, Garland HO. Intracellular dehydration in the rat made diabetic with streptozotocin: effects of infusion. *J. Endocrinol.* 1991; 128: 333-337.

Arnlov J, Lind L, Andren B, Riserus U, Berglund L, Lithell H. A Doppler-derived index of combined left ventricular systolic and diastolic function is an independent predictor of cardiovascular mortality in elderly men. *Am Heart J.* 2005; 149: 902-907.

Balke CW, Shorofsky SR. Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res.* 1998; 37(2):290-9.

Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S, Epstein SE, Unger EF. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation*. 1994b; 89(5): 2183-2189.

Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E, Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 1994a; 28: 1176-1179.

Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: Species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol (Lond)*. 1994; 476: 279–293.

Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature (London)*. 2002; 415,6868: 298-205.

Bigi R, Desideri A, Rambaldi R, Cortigiani L, Sponzilli C, Fiorentini C. Angiographic and prognostic correlates of cardiac output by cardiopulmonary exercise testing in patients with anterior myocardial infarction. *Chest*. 2001; 120(3):825-33.

Bigger JT, Fleiss JL, Steinman RC, Rolnitzky LM, Schneider WJ, Stein PK. RR variability in healthy, middle-aged persons compared with patients with chronic coronary heart disease or recent acute myocardial infarction. *Circulation*. 1995; 1; 91(7): 1936-43.

Binkley PF, Nunziata E, Haas GJ, Nelson SD, Cody RJ. Parasympathetic withdrawal is an integral component of autonomic imbalance in congestive heart failure: demonstration in human subjects and verification in a paced canine model of ventricular failure. *J Am Coll Cardiol*. 1991; 18: 464–472.

Bokník P, Fockenbrock M, Herzig S, Knapp J, Linck B, Lüss H, Müller FU, Müller T, Schmitz W, Schröder F, Neumann J. Protein phosphatase activity is increased in a rat model of long-term beta-adrenergic stimulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2000;362(3):222-31.

Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res.* 2002; 512 (2-3): 121-34.

Borges GR, de Oliveira M, Salgado HC, Fazan R Jr. Myocardial performance in conscious streptozotocin diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2006; 4;5:26.

Boyer JK, Thanigaraj S, Schechtman KB, Pérez JE. Prevalence of ventricular diastolic dysfunction in asymptomatic, normotensive patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2004; 1;93(7):870-5.

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.

Brands MW, Fitzgerald SM, Hewitt WH, Hailman AE. Decreased cardiac output at the onset of diabetes: renal mechanisms and peripheral vasoconstriction. *Endocrinology and Metabolism.* 2001; 278: E917-E924.

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med.* 1982; 307: 205–211.

Brixius K, Wollmer A, Bölck B, Mehlhorn U, Schwinger RH. Ser16-, but not Thr17-phosphorylation of phospholamban influences frequency-dependent force generation in human myocardium. *Pflugers Arch.* 2003; 447(2):150-7.

Broberg CS, Pantely GA, Barber BJ. Validation of myocardial performance index by echocardiography in mice: a noninvasive measure of left ventricular function. *J Am Soc Echocardi.* 2003; 16: 814-823.

Brooks GA, White TP. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol.* 1978; 45(6): 1009-15.

Buñag RD, Tomida T, Sasaki S. Streptozotocin diabetic rats are hypertensive despite reduced hypothalamic responsiveness. *Hypertension*. 1982; 4: 556-565.

Callif RM, Bounos P, Horrel FE et al. The prognosis in the presence of coronary artery disease. In: Braunwood E, Mock MB, Watson J eds. *Congestive heart failure*, Grune and Stratton; 1992. 31-40.

Campos Filho O, Gi MA, Tatani SB. Ecocardiografia doppler. In: Nobre F, Serrano Jr, CV. *Tratado de cardiologia da Socesp*. Barueri: Manole; 2005. 179-215.

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.

Carrier GO, Aronstam RS. Altered muscarinic receptor properties and function in the heart in diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987; 242(2): 531-5.

Chang KS, Lund DD. Alterations in the baroreceptor reflex control of heart rate in streptozotocin diabetic rats. *J Mol Cell Cardiol*. 1986; 18(6): 617-24.

Chattou S, Diacono J, Feuvray D. Decrease in sodium-calcium exchange and calcium currents in diabetic rat ventricular myocytes. *Acta Physiol Scand*. 1999; 166(2):137-44.

Chien KR. Stress pathways and heart failure. *Cell (Cambridge)*. 1999; 98(5): 555-8.

Choi KM, Zhong Y, Hoit BD, Grupp IL, Hahn H, Dilly KW, Guatimosim S, Lederer WJ, Matlib MA. Defective intracellular Ca (2+) signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 283(4):H1398-408.

Chu G, Kranias EG. Phospholamban as a therapeutic modality in heart failure. *Novartis Found Symp*. 2006; 274:156-71; discussion 172-5, 272-6.

Cohen AJ, McCarthy DM, Rossetti RR. Renin secretion by the spontaneously diabetic rat. *Diabetes*. 1986; 35(3):341-6.

Colucci WS & Braunwald E. Fisiopatologia da insuficiência cardíaca. In: Braunwald E, Zipes DP, Libby P. *Tratado de medicina cardiovascular*. 6ª edição. São Paulo: Roca; 2003. v. 1, p. 506-538.

Cohn JN. Sympathetic nervous system activity and the heart. *Am J Hypertens*. 1989; 2(12) Pt 2: 353S-356S.

Corr P, Pearle D, Hinton J, Roberts W, Gillis R. Site of myocardial infarction: a determinant of the cardiovascular changes induced in the cat by coronary occlusion. *Circ. Res*. 1976; 39:840-847.

Cowley Jr A, Franchini KG. Autonomic control of blood vessels. In: D. Robertson (Ed.). *Primer on the Autonomic Nervous System*. San Diego: Academic Press; 1996. p.49-55.

Dall'Ago P, Fernandes TG, Machado UF, Belló AA, Irigoyen MC. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res*. 1997; 30(1):119-24.

Dall'ago P, D'Agord Schaan B, da Silva VO, Werner J, da Silva Soares PP, de Angelis K, Irigoyen MC. Parasympathetic dysfunction is associated with baroreflex and chemoreflex impairment in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Auton Neurosci*. 2007 Jan 30;131(1-2):28-35.

Dall'Ago P, Silva VO, De Angelis KL, Irigoyen MC, Fazan R Jr, Salgado HC. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. *Braz J Med Biol Res*. 2002; 35(7):843-9.

Daniels MC, Naya T, Rundell VL, de Tombe PP. Development of contractile dysfunction in rat heart failure: hierarchy of cellular events. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007; 293(1):R284-92.

Dash R, Kadambi V, Schmidt AG, Tepe NM, Biniakiewicz D, Gerst MJ, Canning AM, Abraham WT, Hoit BD, Liggett SB, Lorenz JN, Dorn GW 2nd, Kranias EG. Interactions between phospholamban and beta-adrenergic drive may lead to cardiomyopathy and early mortality. *Circulation*. 2001; 13;103(6):889-96.

De Angelis K, Leirner AA, Irigoyen MC, Cestari IA. Nonstimulated cardiomyoplasty improves hemodynamics in myocardial-infarcted rats. *Artif Organs*. 2001 Nov; 25(11):939-43.

De Angelis KL, Cestari IA, Barp J, Dall'Ago P, Fernandes TG, de Bittencourt PI, Belló-Klein A, Belló AA, Llesuy S, Irigoyen MC. Oxidative stress in the latissimus dorsi muscle of diabetic rats. *Braz J Med Biol Res*. 2000a Nov; 33(11): 1363-8.

De Angelis KL, Oliveira AR, Dall'Ago P, Peixoto LR, Gadonski G, Lacchini S, Fernandes TG, Irigoyen MC. Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res*. 2000b Jun; 33(6): 635-41.

De Angelis KLD, Oliveira AR, Werner A, Bock P, Belló-Klein A, Irigoyen MC. Exercise training in aging: hemodynamic, metabolic, and oxidative stress evaluations. *Hypertension*. 1997; 30 (3) 2: 767-71.

De Angelis K, Schaan BD, Maeda CY, Dall'Ago P, Wichi RB, Irigoyen MC. Cardiovascular control in experimental diabetes. *Braz J Med Biol Res*. 2002 Sep; 35(9): 1091-100.

De Angelis K, Schaan BD, Rodrigues B, Malfitano C, Irigoyen MC. Cardiovascular autonomic dysfunction in experimental diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007; 51/2:185-194.

De Brusk RF. Evaluation of patients after recent acute myocardial infarction. American College of Physicians. *Ann Intern Med*. 1989; 110 (6) 15: 485-8.

De Felice A, Frering R, Horan P. Time course of hemodynamic changes in rats with healed severe myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1989;257 (1 Pt 2):H289-96.

Diaz A, Bourassa MG, Guertin MC, Tardif JC. Long-term prognostic value of resting heart rate in patients with suspected or proven coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2005; 26(10): 967-74.

Di Bonito P, Cuomo S, Moio N, Sibilio G, Sabatini D, Quattrin S, Capaldo B. Diastolic dysfunction in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus of short duration. *Diabet Med.* 1996;13 (4): 321-4.

Ding A, Rodrigues B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291:H1489-506.

Diretrizes (II) da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca. *Arq Bras Cardiol.* 2002; 79: supl. IV.

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.

Drexler H, Depenbusch JW, Truog AG, Zelis R, Flaim SF. Effects of diltiazem on cardiac function and regional blood flow at rest and during exercise in a conscious rat preparation of chronic heart failure (myocardial infarction). *Circulation.* 1985; 71(6): 1262-70.

Drexler H, Riede U, Münzel T, König H, Funke E, Just H. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation.* 1992; 85 (5): 1751-9.

Dutcher JR, Kahn J, Grines C, Franklin B. Comparison of left ventricular ejection fraction and exercise capacity as predictors of two- and five-year mortality following acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2007 Feb 15; 99(4): 436-41.

Eckberg DL, Drabinsky M, Braunwald E. Defective cardiac parasympathetic control in patients with heart disease. *N. Engl. J. Med.* 1971; 285: 877-883.

Eckberg DL, Harkins SW, Fritsch JM, Musgrave GE, Gardner DF. Baroreflex control of plasma norepinephrine and heart period in healthy subjects and diabetic patients. *J Clin Invest.* 1986; 78(2):366-74.

Eisenhofer G, Friberg P, Rundqvist B, Quyyumi AA, Lambert G, Kaye DM, Kopin IJ, Goldstein DS, Esler MD. Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure. *Circulation*. 1996; 93: 1667–1676.

Eisner DA, Choi HS, Diaz ME, O'Neill SC, Trafford AW. Integrative analysis of calcium cycling in cardiac muscle. *Circ Res*. 2000; 87: 1087–1094.

Elser D, Riegger GAJ. Characteristics and clinical relevance of animal models of heart failure. *Cur Opin Cardiol*. 1995; 10: 253-259.

Elsner D, Riegger GA. Characteristics and clinical relevance of animal models of heart failure. *Cur Opin Cardiol*. 1995; 10: 253-259.

Esler M, Kaye D, Thompson J, Jennings G, Cox H, Turner A, Lambert G, Seals D. Effects of aging on epinephrine secretion and regional release of epinephrine from the human heart. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80(2): 435-42.

Ewing DJ, Campbell IW, Clarke BF. The natural history of diabetic autonomic neuropathy. *Q J Med*. 1980; 49: 95-108.

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.

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.

Fazan R Jr, Dias da Silva VJ, Ballejo G, Salgado HC. Power spectra of arterial pressure and heart rate in streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Hypertens*. 1999; 17(4):489-95.

Fazan R, Irigoyen MC, Moraes MFD, Maeda CY, Salgado HC. Baroreceptor function in short-term streptozotocin diabetic rats. *Hypertension (Abstract)*. 1995; 25: 1398.



Fein FS, Kornstein LB, Strobeck JE, Capasso JM, Sonnenblick EH. Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circulation research*. 1980; 47: 922-933.

Fein FS, Miller B, Flores M, Morton E. Myocardial adaptation to chronic propranolol therapy in diabetic rats. *J. Cardio Pharmacol*. 1991; 260: H647-H649.

Felder RB, Thames MD. Interaction between cardiac receptors and sinoaortic baroreceptors in the control of efferent cardiac sympathetic nerve activity during myocardial ischemia in dogs. *Circ Res*. 1979; 45(6): 728-36.

Feldman AM. Modulation of adrenergic receptors and G-transduction proteins in failing human ventricular myocardium. *Circulation*. 1993; 87(5 Suppl): IV27-34.

Feldman PD, Moises HC. Electrophysiological evidence for alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors in solitary tract nucleus. *Am J Physiol*. 1988; 254(4) Pt 2: H756-62.

Ferrari R, Ceconi C. Neuroendocrine activation in left ventricular dysfunction. *Eur Heart J*. 1998; 19(10): 1423-4.

Fletcher PJ, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function. *Circ Res*. 1981; 49(3): 618-26.

Ferrat R, Sebbag L, Wiernsperger N, Guidollet J, Renaud S, de Lorgeril M. Acute myocardial infarction in dogs with experimental diabetes. *Cardiovasc Res*. 1993; 27(11): 1908-12.

Francis GS. The relationship of the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system in congestive heart failure. *Am. Heart J*. 1989; 118: 642-648.

Francis J, Weiss RM, Wei SG, Johnson AK, Felder RB. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 281: R1734-R1745.

Gagliardino JEA. Um modelo de programa educacional para pessoas diabéticas tipo2. In: (Ed.). *Diabetes Care*: Alexandria, 2002. Um modelo de programa educacional para pessoas diabéticas tipo2., p.12

Galinier M, Pathak A, Fourcade J, Androdias C, Curnier D, Varnous S, Boveda S, Massabuau P, Fauvel M, Senard JM, and Bounhoure JP. Depressed low frequency power of heart rate variability as an independent predictor of sudden death in chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2000; 21: 475–482.

Ghosh S, Standen NB, Galiñanes M. Failure to precondition pathological human myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 1, 37(3):711-8.

Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. 1996; 19: 257-65.

Gottsäter A, Ahlgren AR, Taimour S, Sundkvist G. Decreased heart rate variability may predict the progression of carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. *Clin Auton Res*. 2006; 16(3): 228-34.

Gotzsche O. Myocardial cell dysfunction in diabetes mellitus. A review of clinical and experimental studies. *Diabetes*. 1986; 35(10): 1158-62.

Graham LN, Smith PA, Stoker JB, Mackintosh AF, Mary DA. Time course of sympathetic neural hyperactivity after uncomplicated acute myocardial infarction. *Circulation*. 2002; 106: 793–797.

Grassi G, Mancia G. Physiopatologic and clinical features of hypertensive cardiopathy. *Cardiologia*. 1994; 39 (12): 291-294.

Gray A, Clarke P, Farmer A, Holman R; United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Implementing intensive control of blood glucose concentration and blood pressure in type 2 diabetes in England: cost analysis (UKPDS 63). *BMJ*. 2002; 325 (7369): 860.

Gu K, Cowie CC, Harris ML. Diabetes and decline in heart disease mortality in U.S. adults. *JAMA*. 1999; 281: 1291-7.

Gupta RC, Mishra S, Rastogi S, Imai M, Habib O, Sabbah HN. Cardiac SR-coupled PP1 activity and expression are increased and inhibitor 1 protein expression is decreased in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285(6): H2373-81.

Guyton, A. C. Fisiologia Humana. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 1981.

Guzzetti S, Cogliati C, Turiel M, Crema C, Lombardi F, Malliani A. Sympathetic predominance followed by functional denervation in the progression of chronic heart failure. *Eur Heart J*. 1995;16(8): 1100-7.

Guzzetti S, Spyrou N, Rosen SD, Mezzetti S, Martinoli E, Foale RA, Camici PG. Low frequency spectral component of heart rate variability and myocardial beta-adrenoceptor density after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2002; 97(1):97-104.

Hagemann D, Kuschel M, Kuramochi T, Zhu W, Cheng H, Xiao RP. Frequency-encoding Thr17 phospholamban phosphorylation is independent of Ser16 phosphorylation in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2000; 275(29): 22532-6.

Hageman GR, Gantenberg NS. Attenuation of baroreflex changes in cardiac sympathetic efferent activities during acute myocardial ischemia. *Am Heart J*. 1993; 126(2): 347-51.

Hajjar RJ, Müller FU, Schmitz W, Schnabel P, Böhm M. Molecular aspects of adrenergic signal transduction in cardiac failure. *J Mol Med*. 1998; 76(11):747-55.

Harjai KJ, Stone GW, Boura J, Mattos L, Chandra H, Cox D, Grines L, O'Neill W, Grines C; Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Investigators. Comparison of outcomes of diabetic and nondiabetic patients undergoing primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2003 May 1; 91(9):1041-5.

Harthmann AD, De Angelis K, Costa LP, Senador D, Schaan BD, Krieger EM, Irigoyen MC. Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats. *Auton Neurosci*. 2007 May 30;133(2):115-20.

Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H. Relationship between Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation*. 1999 Feb 9; 99(5): 641-8.

Hatem SN, Sham JS, Morad M. Enhanced Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange activity in cardiomyopathic Syrian hamster. *Circ Res*. 1994 Feb; 74(2): 253-61.

Hattori Y, Matsuda N, Kimura J, Ishitani T, Tamada A, Gando S, Kemmotsu O, Kanno M. Diminished function and expression of the cardiac Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger in diabetic rats: implication in Ca<sup>2+</sup> overload. *J Physiol*. 2000 Aug 15; 527 Pt 1:85-94.

Homma S, Yamazaki Y, Karakida T. Blood pressure and heart rate relationships during cervical sympathetic and vagus nerve stimulation in streptozotocin diabetic rats. *Brain Res*. 1993 Dec 3; 629(2): 342-4.

Huang B, Wang S, Qin D, Boutjdir M, El-Sherif N. Diminished basal phosphorylation level of phospholamban in the postinfarction remodeled rat ventricle: role of beta-adrenergic pathway, G(i) protein, phosphodiesterase, and phosphatases. *Circ Res*. 1999 Oct 29; 85(9): 848-55.

Ishise H, Asanoi H, Ishizaka S, Joho S, Kameyama T, Umeno K, Inoue H. Time course of sympathovagal imbalance and left ventricular dysfunction in conscious dogs with heart failure. *J Appl Physiol*. 1998; 84: 1234–1241.

Jackson CV, Carrier GO. Influence of short-term experimental diabetes on blood pressure and heart rate in response to norepinephrine and angiotensin II in the conscious rat. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1983; 5(2):260-5.

Jegger D, Jeanrenaud X, Nasratullah M, Chassot P, Mallik A, Tevaearai H, von Segesser LK, Segers P, Stergiopoulos N. Noninvasive Doppler-derived myocardial performance index in rats with myocardial infarction: validation and correlation by conductance catheter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290: H1540–H1548.

Jiang MT, Lokuta AJ, Farrell EF, Wolff MR, Haworth RA, Valdivia HH. Abnormal Ca<sup>2+</sup> release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure. *Circ Res*. 2002 Nov 29; 91(11): 1015-22.

Jikuhara T, Sumimoto T, Tarumi N, Yuasa F, Hattori T, Sugiura T, Iwasaka T. Left atrial function as a reliable predictor of exercise capacity in patients with recent myocardial infarction. *Chest*. 1997 Apr; 111(4): 922-8.

Joffe II, Travers KE, Perreault-Micali CL, Hampton T, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS. Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetic rat: noninvasive assessment with doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway. *J. Amer. Coll. Cardiol.* 1999; 34, (7): 2111-19.

Julian DB, Braunwald E. Preface. In: J. B. Desmond, E. (Ed.). *Management of Acute Myocardial Infarction*. London: Paston, 1994. Preface, p.1.

Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest*. 1969 Nov; 48(11): 2129-39.

Kagaya Y, Hajjar RJ, Gwathmey JK, Barry WH, Lorell BH. Long-term angiotensin-converting enzyme inhibition with fosinopril improves depressed responsiveness to Ca<sup>2+</sup> in myocytes from aortic-banded rats. *Circulation*. 1996; 94: 2915-22.

Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol*. 1974; 34: 29-34.

Kawashima H, Igarashi T, Nakajima Y, Akiyama Y, Usuki K, Ohtake S. Chronic hypertension induced by streptozotocin in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1978; 305: 123-126.

Kienzle MG, Ferguson DW, Birkett CL, Myers GA, Berg WJ, and Mariano DJ. Clinical, hemodynamic and sympathetic neural correlates of heart rate variability in congestive heart failure. *Am J Cardiol*. 1992; 69: 761– 767.

Kiss E, Ball NA, Kranias EG, Walsh RA. Differential changes in cardiac phospholamban and sarcoplasmic reticular Ca<sup>2+</sup>-ATPase protein levels. Effects on Ca<sup>2+</sup> transport and mechanics in compensated pressure-overload hypertrophy and congestive heart failure. *Circ Res*. 1995 Oct; 77(4): 759-64.

Koike MK, Consolim-Colombo FM, Ida F, Moreira ED, Krieger EM. Baroreceptor function after myocardial infarction in rats. In: *Scientific Meeting of the international Society of Hypertension (abstract)*. 1996; 16. Glasgow: p. 478.

Krizsan-Agbas D, Bunag RD. Normotensive diabetic BB/W rats show enhanced reflex tachycardia. *Diabetes*. 1991; 40(11): 1504-10.

Kruger C, Kalenka A, Haunstetter A, Schweizer M, Maier C, Ruhle U, Ehmke H, Kubler W, Haass M. Baroreflex sensitivity and heart rate variability in conscious rats with myocardial infarction. *Heart Circ Physiol*. 1997; 42: H2240-H2247.

Lacerda, J. E. C. Estudo da Atividade Simpática em ratos submetidos ao infarto do miocárdio. *Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (tese)*, São Paulo, 2000.

Lange BT. Exercise spirometry in medical practice. *Rev. Med Liege*, 2001; 56(4): 228-32.

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.

La Rovere MT, Bigger JT Jr, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet*. 1998 Feb 14;351(9101):478-84.

La Rovere MT, Pinna GD, Maestri R, Mortara A, Capomolla S, Febo O, Ferrari R, Franchini M, Gnemmi M, Opasich C, Riccardi PG, Traversi E, Cobelli F. Short-term heart rate variability strongly predicts sudden cardiac death in chronic heart failure patients. *Circulation*. 2003 Feb 4; 107(4): 565-70.

Liu YH, Yang XP, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA. Chronic heart failure induced by coronary artery ligation in Lewis inbred rats. *Am J Physiol*. 1997 Feb; 272(2 Pt 2): H722-7.

Lokuta AJ, Rogers TB, Lederer WJ, Valdivia HH. Modulation of cardiac ryanodine receptors of swine and rabbit by a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. *J Physiol*. 1995 Sep 15; 487 ( Pt 3): 609-22.

Lombardi F, Sandrone G, Spinnler MT, Torzillo D, Lavezzaro GC, Brusca A, Malliani A. Heart rate variability in the early hours of an acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1996 May 15; 77(12): 1037-44.

Lu L, Mei DF, Gu AG, Wang S, Lentzner B, Gutstein DE, Zwas D, Homma S, Yi GH, Wang J. Exercise training normalizes altered calcium-handling proteins during development of heart failure. *J Appl Physiol*. 2002 Apr; 92(4): 1524-30.

Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res*. 1994 Sep; 75(3): 401-9.

Mace LC, Palmer BM, Brown DA, Jew KN, Lynch JM, Glunt JM, Parsons TA, Cheung JY, Moore RL. Influence of age and run training on cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. *J Appl Physiol*. 2003 Nov; 95(5): 1994-2003.

Madsen EB, Hougaard P, Gilpin E. Dynamic evaluation of prognosis from time-dependent variables in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1983 Jun; 51(10): 1579-83.

Maeda CY, Fernandes TG, Lulher F, Irigoyen MC. Streptozotocin diabetes modifies arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. *Braz J Med Biol Res*. 1995a; 28(4) Apr: 497-501.

Maeda CY, Fernandes TG, Timm HB, Irigoyen MC. Autonomic dysfunction in short-term experimental diabetes. *Hypertension*. 1995b; 26(6) Pt 2, Dec: 1100-4.

Mahler DA, Franco MJ. Clinical applications of cardiopulmonary exercise testing. *J Cardiopulm Rehabil*. 1996; 16(6), Nov-Dec: 357-65.

Malmberg K, Rydén L. Myocardial infarction in patients with diabetes mellitus. *Eur Heart J*. 1988 Mar;9(3):259-64.

Marks AR. Cardiac intracellular calcium release channels: role in heart failure. *Circ Res*. 2000 Jul 7; 87(1): 8-11.

Marks AR. Ryanodine receptors/calcium release channels in heart failure and sudden cardiac death. *J Mol Cell Cardiol*. 2001 Apr; 33(4): 615-24.

Mathey D, Bleifeld W, Hanrath P, Effert S. Attempt to quantitative relation between cardiac function and infarct size in acute myocardial infarction. *Br. Heart J*. 1974; 36: 271-279.

Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res*. 2005 Dec 1; 68(3): 366-75.

Medeiros A, Rolim NP, Oliveira RS, Rosa KT, Mattos KC, Casarini DE, Irigoyen MC, Krieger EM, Krieger JE, Negrao CE, Brum PC. Exercise Training Delays Cardiac Dysfunction and Prevents Calcium Handling Abnormalities in Sympathetic Hyperactivity-Induced Heart Failure Mice. *J Appl Physiol*. 2007. *in process*.

Meggs LG, Coupet J, Huang H, Cheng W, Li P, Capasso JM, Homcy CJ, Anversa P. Regulation of Angiotensin II receptors on ventricular myocytes after myocardial infarction in rats. *Circulation Research*. 1993; 72: 1149-1162.

Mésangeau D, Laude D, Elghozi JL. Early detection of cardiovascular autonomic neuropathy in diabetic pigs using blood pressure and heart rate variability. *Cardiovasc Res*. 2000 Mar; 45(4): 889-99.

Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1995 Aug 15; 92(4): 778-84.



Meyrelles SS, Cabral AM, Vasquez EC. Impairment of the Bezold-Jarisch reflex in conscious rats with myocardial hypertrophy. *Braz J Med Biol Res.* 1994 Apr; 27(4): 1065-9.

Miao CY, Su DF. The importance of blood pressure variability in rat aortic and left ventricular hypertrophy produced by sinoaortic denervation. *J. Hypertens.* 2002; 20 (9): 1865-1872.

Mill JG, Milanez Mda C, Busatto VC, de Moraes AC, Gomes Mda G. Activation of the cardiac angiotensin-converting enzyme after myocardial infarction and its role in ventricular remodeling. *Arq Bras Cardiol.* 1997 Aug; 69(2): 101-10.

Mill JG, Stefanon I, Leite CM, Vassallo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc Res.* 1990; 24(9): 748-753.

Mill JG, Vassallo DV, Leite CM. Time course of changes in heart rate and sympathetic tone after coronary artery ligation in rats. *Braz J Med Biol Res.* 1991; 24(8): 855-8.

Ming W, Gibbons LW, Kampert JB, Nichaman MZ, Blair SN. Low cardiorespiratory fitness and physical inactivity as predictors of mortality in men with type 2 diabetes. *Annals of Internal Medicine.* 2001; 132: 605-61.

Mircoli L, Fedele L, Benetti M, Bolla GB, Radaelli A, Perlini S, Ferrari AU. Preservation of the baroreceptor heart rate reflex by chemical sympathectomy in experimental heart failure. *Circulation.* 2002; 106: 866-872.

Moisés V, Ferreira RL, Nozawa E, Kanashiro RM, Campos Filho O, Andrade JL, Carvalho ACC, Tucci PJ. Structural and functional characteristics of rat hearts with and without myocardial infarct. Initial experience with doppler echocardiography. *Arq. Bras. Cardiol.* 2000; 75(2): 131-136.

Monckton G, Pehowich E. Autonomic neuropathy in the streptozotocin diabetic rat. *Can J Neurol Sci.* 1980; 7(2): 135-42.

Motte S, Mathieu M, Brimioulle S, Pensis A, Ray L, Ketelslegers JM, Montano N, Naeije R, van de Borne F, Mc Entee K. Respiratory-related heart rate variability in progressive experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289: 1729-1735.

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.

Negrao CE, Middlekauff HR. Adaptations in autonomic function during exercise training in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2008 Feb;13(1): 51-60 in process.

Negrao CE, Moreira ED, Santos MC, Farah VM, Krieger EM. Vagal function impairment after exercise training. *J Appl Physiol*. 1992 May; 72(5): 1749-53.

Netticadan R, Temsah K, Kawabata, Dallha NS. Sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase is altered in heart failure. *Circ Res*. 2000; 86: 596-605.

Netticadan T, Temsah RM, Kent A, Elimban V, Dhalla NS. Depressed levels of  $Ca^{2+}$ -cycling proteins may underlie sarcoplasmic reticulum dysfunction in the diabetic heart. *Diabetes*. 2001 Sep; 50(9): 2133-8.

*Neumann C, Martinez D, Schmid H. Nocturnal oxygen desaturation in diabetic patients with severe autonomic neuropathy. Diabetes Res Clin Pract. 1995; 28: 97-102.*

Neumann J, Boknik P, Herzig S, Schmitz W, Scholz H, Gupta RC, Watanabe AM. Evidence for physiological functions of protein phosphatases in the heart: evaluation with okadaic acid. *Am J Physiol*. 1993 Jul; 265(1 Pt 2): H257-66.

Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H, Zimmermann N. Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Jan; 29(1): 265-72.

Nozawa E, Kanashiro RM, Murad N, Carvalho AC, Cravo SL, Campos O, Tucci PJ, Moises VA. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2006 May; 39(5): 687-95.

Osculati G, Grassi G, Giannattasio C, Seravalle G, Valagussa F, Zanchetti A, Mancia G. Early alterations of the baroreceptor control of heart rate in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 1990 Mar; 81(3): 939-48.

Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S, Rimoldi O, Furlan R, Pizzinelli P, Sandrone G, Malfatto G, Dell'Orto S, Piccaluga E, et al. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res.* 1986 Aug; 59(2): 178-93.

Pagani M, Malfatto G, Pierini S, Casati R, Masu A, Poli M, Guzzetti S, Lombardi F, Cerutti S, Malliani A. A spectral analysis of heart rate variability in the assessment of autonomic diabetic neuropathy. *J Auton Nerv Syst.* 1988; 23:143-153.

Pagani M, Montano N, Porta A, Malliani A, Abboud FM, Birkett C, Somers VK. Relationship between spectral components of cardiovascular variabilities and direct measures of muscle sympathetic nerve activity in humans. *Circulation.* 1997 Mar 18; 95(6): 1441-8.

Page MM, Watkins PJ. *Cardiorespiratory arrest and diabetic autonomic neuropathy.* Lancet. 1978; 1: 14-16.

Pawlus DG, Moore RL, Musch TI, Davidson WR Jr. Echocardiographic evaluation of size, function, and mass of normal and hypertrophied rat ventricles. *J Appl Physiol.* 1993 May; 74(5): 2598-605.

Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990; 81(4) Apr:1161-72.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979 Apr; 44(4): 503-12.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1991 May; 260 (5 Pt 2): H1406-14.

Pickup JC, Willians G. Chronic complications of diabetes. *Blackwell Science*. 1994; 41: 1151-1160.

Ponikowski P, Chua TP, Piepoli M, Ondusova D, Webb-Peploe K, Harrington D, Anker SD, Volterrani M, Colombo R, Mazzuero G, Giordano A, Coats AJ. Augmented peripheral chemosensitivity as a potential input to baroreflex impairment and autonomic imbalance in chronic heart failure. *Circulation*. 1997; 96(8): 2586-2594.

Poornima IG, Parikh P, Shannon RP. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circ Res*. 2006; 98: 596-605.

Ravingerová T, Neckár J, Kolár F. Ischemic tolerance of rat hearts in acute and chronic phases of experimental diabetes. *Mol Cell Biochem*. 2003 Jul; 249(1-2): 167-74.

Raya TE, Gaballa M, Anderson P, Goldman S. Left ventricular function and remodeling after myocardial infarction in aging rats. *Am J Physiol*. 1997 Dec; 273 (6 Pt 2): H2652-8.

Regan TJ, Ahmed S, Haider B, Moschos C, Weisse A. Diabetic cardiomyopathy: experimental and clinical observations. *NJ Med*. 1994 Nov; 91(11): 776-8.

Reiken S, Gaburjakova M, Guatimosim S, Gomez AM, D'Armiento J, Burkhoff D, Wang J, Vassort G, Lederer WJ, Marks AR. Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *J Biol Chem*. 2003 Jan 3; 278(1): 444-53.

Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev*. 1970 Dec; 22(4): 485-518.

Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda C, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2007; 6:38.

Rodrigues, B., Irigoyen MC, De Angelis K. Correlation between speed and oxygen consumption (VO<sub>2</sub>) in rats submitted to maximum exercise test. *Fiep Bulletin*. 2006; 76: 231-233.

Rolim NP, Mattos KC, Brum PC, Baldo MV, Middlekauff HR, Negrão CE. The decreased oxygen uptake during progressive exercise in ischemia-induced heart failure is due to reduced cardiac output rate. *Braz J Med Biol Res*. 2006 Feb; 39(2): 297-304.

Rolim NP, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, Krieger JE, Negrão CE, Brum PC. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca<sup>2+</sup> handling protein expression in heart failure. *Physiol Genomics*. 2007 May 11; 29(3):246-52.

Rouyer O, Zoll J, Daussin F, Damgé C, Helms P, Talha S, Rasseneur L, Piquard F, Geny B. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on skeletal muscle oxidative function and exercise capacity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Physiol*. 2007 Nov; 92(6): 1047-56.

Roveda F, Rolim N, Reis SF. Exercício físico e insuficiência cardíaca. In: Negrão CE, Barretto ACP. *Cardiologia do Exercício*. Barueri-SP. Manole. 2005 :p.179-189.

Rydén L, Malberg K. Treatment of coronary heart disease in patients with diabetes. In: Stanley W, Rydén L, eds. *The diabetic coronary patient*. London: Science Press Ltd; 2003.

Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978 Dec; 58(6): 1072-83.

Said M, Mundiña-Weilenmann C, Vittone L, Mattiazzi A. The relative relevance of phosphorylation of the Thr(17) residue of phospholamban is different at different levels of beta-adrenergic stimulation. *Pflugers Arch*. 2002 Sep; 444(6): 801-9.

Salemi VM, Pires MD, Cestari IN, Picard MH, Leirner AA, Mady C. Echocardiographic assessment of global ventricular function using the myocardial performance index in rats with hypertrophy. *Artificial Org.* 2004; 28: 332-7.

Sande JB, Sjaastad I, Hoen IB, Bøkenes J, Tønnessen T, Holt E, Lunde PK, Christensen G. Reduced level of serine(16) phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: a major contributor to reduced SERCA2 activity. *Cardiovasc Res.* 2002 Feb 1; 53(2): 382-91.

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 Dec; 37(12): 1895-902.

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.

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.

Schillinger W, Teucher N, Christians C, Kohlhaas M, Sossalla S, Van Nguyen P, Schmidt AG, Schunck O, Nebendahl K, Maier LS, Zeitz O, Hasenfuss G. High intracellular Na<sup>+</sup> preserves myocardial function at low heart rates in isolated myocardium from failing hearts. *Eur J Heart Fail.* 2006 Nov; 8(7): 673-80.

Schmidt RE, Plurad SB, Modert CW. Experimental diabetic autonomic neuropathy characterization in streptozotocin-diabetic Sprague-Dawley rats. *Lab Invest.* 1983 Nov; 49(5): 538-52.

Schwartz H, Leiboff R.H., Bren GB, Wasserman A.G, Katz R.J., Varghese P.J, Sokil A.B, Ross A.M. Temporal evolution of the human coronary collateral circulation after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1984; 4:1088-1093.

Schwinger RH, Münch G, Bölk B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E. Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* 1999 Mar; 31(3): 479-91.

Sigvardsson K, Svanfeldt E, Kilbom A. Role of the adrenergic nervous system in development of training-induced bradycardia. *Acta Physiol Scand.* 1977 Dec; 101(4): 481-8.

Simões MV, Marques F, O'Connell JL. Diagnóstico, classificação e avaliação prognóstica da insuficiência cardíaca. In: Nobre F. e Serrano Jr CV. *Tratado de cardiologia da Socesp.* Barueri-SP. Manole. 2005: p.750-761.

Soares PP, da Nóbrega 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.

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.

Stefanon I, Martins MA, Vassallo DV, Mill JG. Analysis of right and left ventricular performance of the rat heart with chronic myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res.* 1994 Nov; 27(11): 2667-79.

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.

Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Böhm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, Drexler H. Gene expression of the cardiac Na(+)-Ca2+ exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res.* 1994 Sep; 75(3): 443-53.

Studer R, Reinecke H, Vetter R, Holtz J, Drexler H. Expression and function of the cardiac Na+/Ca2+ exchanger in postnatal development of the rat, in experimental-induced cardiac hypertrophy and in the failing human heart. *Basic Res Cardiol.* 1997; 92 Suppl 1: 53-8.

Takeda Y, Miyamoto I, Yoneda T, Takeda R. Production of endothelin-1 from the mesenteric arteries of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*. 1991; 48: 2553-2556.

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.

Tavares D. Educação conscientizadora do idoso diabético, uma proposta de intervenção do enfermeiro. *Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo - USP (tese)*. 1997 Ribeirão Preto.

Taylor GJ, Humphries JO, Mellits ED, Pitt B, Schulze RA, Griffith LS, Achuff SC. Predictors of clinical course, coronary anatomy and left ventricular function after recovery from acute myocardial infarction. *Circulation*. 1980 Nov; 62(5): 960-70.

Tei C, Nishimura RA, Seward JB, Tajik AJ. Noninvasive doppler-derived myocardial performance index: correlation with simultaneous measurements of cardiac characterization measurements. *J Am Soc Echocardiogr*. 1997; 10: 169-78.

Teshima Y, Takahashi N, Saikawa T, Hara M, Yasunaga S, Hidaka S, Sakata T. Diminished expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and ryanodine sensitive Ca(2+)Channel mRNA in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2000 Apr; 32(4):655-64.

Thieuleux FA, Lablanche JM, Boniface M, Boniface G, Bertrand ME. Hemodynamic and coronariography evaluation for identification of high risk patients following myocardial infarction. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1985; 78(8): 1223-1230.

Tipton CM. Exercise, training and hypertension: an update. *Exerc Sport Sci Rev*. 1991; 19: 447-505.



Tomlinson D, Yusof APM. On the structural and functional integrity of autonomic nerves in rats with long-term diabetes mellitus induced by alloxan. *Br J Pharmacol*. 1981; 74: 84P.

Tosaki A, Engelman DT, Engelman RM, Das DK. Diabetes and ATP-sensitive potassium channel openers and blockers in isolated ischemic/reperfused hearts. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995 Dec; 275(3): 1115-23.

Tune JD, Yeh C, Setty S, Zong P, Downey HF. Coronary blood flow control is impaired at rest and during exercise in conscious diabetic dogs. *Basic Res Cardiol*. 2002 May; 97(3): 248-57.

Unger EF. Experimental evaluation of coronary collateral development. *Cardiovasc Res*. 2001; 49: 497-506.

Vadlamudi RV, Mcneill JH. Effect of experimental diabetes on rat cardiac cAMP, phosphorylase, and inotropy. *Am J Physiol*. 1983; 244(6):H844-51.

Van de Borne P, Montano N, Pagani M, Oren R, Somers VK. Absence of low-frequency variability of sympathetic nerve activity in severe heart failure. *Circulation*. 1997; 95: 1449-1454.

Vasanji Z, Dhalla NS, Netticadan T. Increased inhibition of SERCA2 by phospholamban in the type I diabetic heart. *Mol Cell Biochem*. 2004 Jun; 261(1-2): 245-9.

Vinik AI, Holland MT, Le Beau JM, Liuzzi FJ, Stansberry KB, Colen LB. Diabetic neuropathies. *Diabetes Care*. 1992 Dec; 15(12): 1926-75.

Walberg JL, Ruiz VK, Tarlton SL, Hinkle DE, Thye FW. Exercise capacity and nitrogen loss during a high or low carbohydrate diet. *Med Sci Sports Exerc*. 1988 Feb; 20(1): 34-43.

Webb SW, Adgey AA, Pantridge JF. Autonomic disturbance at onset of acute myocardial infarction. *Br Med J*. 1972 Jul 8; 3(5818): 89-92.

Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Deng SX, Vest JA, Cervantes D, Coromilas J, Landry DW, Marks AR. Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin 2. *Science*. 2004; 304(5668): 292-6.

Wei M, Gibbons LW, Kampert JB, Nichaman MZ, Blair SN. Low cardiorespiratory fitness and physical inactivity as predictors of mortality in men with type 2 diabetes. *Ann Intern Med*. 2000 Apr 18; 132(8): 605-11.

White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation*. 1987 Jul; 76(1): 44-51.

WHO - World Health Organization (on line). Prevalence of Diabetes Among Older Adults in America. 2005a. Disponível em: <http://www.who.int/research/en/>.

WHO - World Health Organization (on line). Cardiovascular Disease and Control: Missed Opportunities. 2005b. Disponível em: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/prevention\\_control/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/prevention_control/en/).

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.

Wichi RB, Souza SB, Casarini DE, Morris M, Barreto-Chaves ML, Irigoyen MC. Increased blood pressure in the offspring of diabetic mothers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288: R1129-33.

Wisløff U, Helgerud J, Støylen A, Ellingsen Ø. Atrioventricular plane displacement in female endurance athletes. *Med Sci Sports Exerc*. 2001 Sep; 33(9): 1503-10..

Wisloff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen O. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca<sup>+2</sup> sensitivity and SERCA2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Research*. 2002; 54(1): 162-74.

Wold LE, Dutta K, Mason MM, Ren J, Cala SE, Schwanke ML, Davidoff AJ. Impaired SERCA function contributes to cardiomyocyte dysfunction in insulin resistant rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2005 Aug; 39(2): 297-307.

Xu G, Takashi E, Kudo M, Ishiwata T, Naito Z. Contradictory effects of short- and long-term hyperglycemias on ischemic injury of myocardium via intracellular signaling pathway. *Exp Mol Pathol.* 2004 Feb; 76(1): 57-65.

Yamada M, Ikeda Y, Yano M, Yoshimura K, Nishino S, Aoyama H, Wang L, Aoki H, Matsuzaki M. Inhibition of protein phosphatase 1 by inhibitor-2 gene delivery ameliorates heart failure progression in genetic cardiomyopathy. *Faseb J.* 2006 Jun; 20(8): 1197-9.

Yamamoto M, Yamasaki Y, Kodama M, Matsuhisa M, Kishimoto M, Ozaki H, Tani A, Ueda N, Iwasaki M, Hori M. Impaired diurnal cardiac autonomic function in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 1999 Dec; 22(12): 2072-7.

Yao A, Su Z, Nonaka A, Zubair I, Spitzer KW, Bridge JH, Muelheims G, Ross J Jr, Barry WH. Abnormal myocyte Ca<sup>2+</sup> homeostasis in rabbits with pacing-induced heart failure. *Am J Physiol.* 1998 Oct; 275(4 Pt 2): H1441-8.

Yelon DM, Alkhulaifi AM, Browne EE, Pugsley WB. Ischaemic preconditioning limits infarct size in the rat heart. *Cardiovasc Res.* 1992 Oct; 26(10): 983-7.

Yu Z, Mcneill JH. Blood pressure and heart rate response to vasoactive agents in conscious diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1992; 70(12): 1542-8.

Yusuf S, Anand S, Avezum A Jr, Flather M, Coutinho M. Treatment for acute myocardial infarction. Overview of randomized clinical trials. *Eur Heart J.* 1996 Dec; 17 Suppl F: 16-29.

Zanetti, M. O diabetes mellitus tipo1 em crianças e adolescentes: um desafio para as mães e profissionais de saúde. *Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo - USP (tese).* 1996: Ribeirão Preto.

Zarain-Herzberg A, Yano K, Elimban V, Dhalla NS. Cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase expression in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Aug 30; 203(1): 113-20.

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.

Zaugg M, Schaub MC. Cellular mechanisms in sympatho-modulation of the heart. *Br J Anaesth*. 2004 Jul; 93(1): 34-52.

Zhong Y, Ahmed S, Grupp IL, Matlib MA. Altered SR protein expression associated with contractile dysfunction in diabetic rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Sep; 281(3): H1137-47.

Zornoff LA, Paiva SA, Matsubara BB, Matsubara LS, Tucci PJ, Spadaro J. Effect of lisinopril on cardiac parameters and mortality after myocardial infarction in rats. *Arq Bras Cardiol*. 1997 Mar;68(3):175-9.