

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

Efeitos do treinamento muscular ventilatório sobre a hemodinâmica, variabilidade da frequência cardíaca e músculos periféricos e diafragma em ratos com diabetes mellitus.

Aluna: Cíntia de Sousa Costa

Orientadora: Prof^a Dr^a. Audrey Borghi Silva

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Adriana Sanches Garcia de Araújo

**São Carlos
2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**Efeitos do treinamento muscular ventilatório sobre a
hemodinâmica, variabilidade da frequência cardíaca e músculos
periféricos e diafragma em ratos com diabetes mellitus.**

CÍNTIA DE SOUSA COSTA

Orientadora: Prof^a Dr^a. Audrey Borghi Silva

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Adriana Sanches Garcia de Araújo

**Dissertação de Mestrado apresentada à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Fisioterapia da
Universidade Federal de São Carlos -
PPG/UFSCar como parte dos requisitos
para obtenção do Título de Mestre em
Fisioterapia.**

**São Carlos
2020**

Sousa Costa, Cínthia de

Efeitos do treinamento muscular ventilatório sobre a hemodinâmica, variabilidade da frequência cardíaca e músculos periféricos e diafragma em ratos com diabetes mellitus. / Cínthia de Sousa Costa -- 2020. 48f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Audrey Borghi Silva
Banca Examinadora: Gerson Jhonatan Rodrigues, Eliane Roseli Winkelmann
Bibliografia

1. Diabetes mellitus. 2. Treinamento muscular ventilatório. 3. Controle autonômico. I. Sousa Costa, Cínthia de. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado
- CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Cíntia de Sousa Costa, realizada em 27/02/2020:

Profa. Dra. Audrey Borghi e Silva
UFSCar

Profa. Dra. Eliane Roseli Winkelmann
UNIJUÍ

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues
UFSCar

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação,

a todos que de alguma forma participaram e colaboraram para que ela fosse realizada!

AGRADECIMENTOS...

...primeiramente **a Deus**, minha gratidão eterna por tudo que Ele realiza em minha vida, pelo cuidado comigo, por sempre manifestar seu amor a cada dia da minha vida...

...a virgem **Maria**, minha doce mãe, por se fazer presente em todos os momentos de minha vida, intercedendo e cuidando de mim...

...a minha **Mãe Cláudia**, pelo amor incondicional, por sempre me deixar livre para ter meus sonhos e não medir esforços e me apoiar na luta para realização deles. Pelas orações, carinho e cuidado nas pequenas coisas, por me incentivar quando tudo parecia dar errado, enfim nunca terei palavras suficientes para expressar toda minha gratidão a você...

... ao meu **Esposo João**, que me acompanhou durante toda essa trajetória, me apoiando de forma que sem ele nada seria possível, obrigada por me incentivar, pela paciência, cuidado, orações e estar ao meu lado em todos os momentos...

...aos meus irmãos **Thales e Nathalí**, por estar sempre presente em minha vida, pelas conversas produtivas e divertidas, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim...

...aos **meus avós**, que mesmo a distancia sempre estão presentes na minha vida, agradeço principalmente o carinho e orações...

...a minha **família**, que eu tanto amo, pelo apoio e amor incondicionais em todos os momentos...

...a todos meus **Amigos**, que me apoiaram e entenderam minha ausência, muitas vezes, nesse período...

...a minha orientadora **Audrey Borghi Silva**, que me abriu as portas pra esse novo universo de aprendizado, por acreditar mesmo com tantos empecilhos e não medir esforços para que ele se concretizasse, e por todo conhecimento e carinho compartilhado serei sempre grata...

...a minha coorientadora **Adriana Sanches Garcia de Araújo**, que se empenhou a cada dia e a cada dificuldade para que esse sonho se tonasse realidade, pela perseverança, paciência, pelo aprendizado, pela amizade e cada momento compartilhado, não teria conseguido sem você...

...ao professor **Rodrigo Jaenisch**, por toda empolgação que me contagiou para esse mundo experimental, por todas as horas que passou nos ensinando as técnicas, pelo aprendizado e pelas conversas que me fizeram acreditar mais em mim...

...a **CNPQ**, por ter acreditado e financiado essa pesquisa. Sem a qual, a realização desse sonho não seria possível...

...ao professor **Thiago Russo**, pelo apoio, por todo ensinamento, por ter acreditado, fazer parte desse sonho conosco e fazer dos experimentos momentos divertidos...

... a técnico de laboratório **Andreia Fujimoto**, que nos ajudou no experimento...

...a professora **Ana Cláudia**, que acreditou e nos ajudou durante todo o experimento, fazendo do momento muito mais descontraído, agradeço por todo aprendizado e por nos deixar usar o biotério do Departamento de Educação Física e Motricidade Humana, enquanto o nosso estava em reforma...

... a **Vanessa Furino**, por todo aprendizado compartilhado, por nos ajudar durante o experimento e com as figuras e o inglês...

...ao professor **Hugo de Souza**, pelo aprendizado, por nos emprestar os equipamentos até a nossa aquisição fosse possível, por nos ajudar com a instalação e manuseio e seus alunos **Katiussia e Bruno** por nos ajudar aperfeiçoar a técnica.

...ao professor **Guilherme Arêas** por todas as horas que passou nos ajudando a aperfeiçoar as técnicas, pelo aprendizado, e amizade...

...ao professor **Gerson Rodrigues**, por nos disponibilizar materiais, por todo conhecimento compartilhado e nos apresentar seu aluno **Thiago** que nos ajudou a aperfeiçoar nossas técnicas.

... a **Isabela**, pela amizade que apenas iniciou no mestrado, pelas conversas, incentivos e sempre que possível ajudar no experimento.

... a **Gabrielle** da AdInstruments, por nos ajudar com a calibração e uso dos aparelhos...

... a **Carol, Genoveva e Thays**, por nos ensinarem a técnica de indução do diabetes por estreptozotocina.

... a **Natalia Tossini** por nos ajudar a cuidar dos animais, e comprar os materiais necessários ao experimento.

... Ao **Programa de Pós Graduação do Departamento de Fisioterapia** da UFSCar e todos os funcionários, por toda disponibilidade e ajuda sempre que foi necessária.

...ao todos do **LACAP**, que me receberam de braços abertos, obrigada por todo carinho e aprendizado partilhado com cada um...

...e a todos que fizeram parte dessa historia...

...os meus mais sinceros agradecimentos.

"Meu caminho é feito de uma alma com pés valentes,
mesmo quando cansados arriscam mais um passo.
É essa doce valentia que me trouxe até aqui!"

Ana Jácomo

RESUMO

Introdução: A diabetes mellitus (DM) é uma das principais doenças crônicas que acomete a população, sendo considerada um grave problema de saúde pública. O treinamento muscular ventilatório (TMV) tem demonstrado melhorar desfechos clínicos em pacientes com DM, entretanto pouco é conhecido sobre o seu efeito em alguns mecanismos fisiopatológicos da DM. Ainda, nenhum estudo verificou os mecanismos hemodinâmicos, variabilidade da frequência cardíaca e muscular promovidos pelo TMV na DM. **Objetivos:** Verificar os efeitos do TMV sobre a hemodinâmica, variabilidade da frequência cardíaca (VFC) em ratos com DM induzida por infusão de estreptozotocina (STZ). **Desenho do Estudo:** Estudo experimental animal. **Métodos:** Trinta e seis ratos Wistar machos foram randomizados em 4 grupos: grupo sham - sedentários (Sham-ST; n=9); grupo sham com TMV (Sham-TMV; n=9); grupo DM - sedentários (DM-ST; n=8) e grupo DM com TMV (DM-TMV; n=8) com perda de dois animais durante o treinamento. A hemodinâmica foi avaliada por canulação central. E a VFC foi medida pelo ECG em ratos saudáveis e com DM induzida por STZ. Além disso, foi verificado o efeito do TMV na área de secção transversa muscular, nos músculos diafragma, tibial anterior e sóleo de ratos saudáveis e com DM. **Resultados** A Indução de DM por STZ acarretou em perda de peso, hiperglicemia, alterações das variáveis hemodinâmicas com a redução da pressão arterial, aumento na FC e uma contração e relaxamento mais lenta do ventrículo esquerdo ($P < 0,05$). Observamos também diminuição do índice RMSSD, e da área de secção transversa dos músculos, com menor área de fibras musculares dos músculos diafragma, do sóleo e do tibial anterior nos ratos diabéticos ($P < 0,05$). Interessantemente, o TMV levou a atenuação da FC nos animais saudáveis e aumento do RMSSD nos ratos diabéticos ($P < 0,05$). **Conclusão:** A indução da DM produz profundas alterações deletérias na musculatura diafragmática e periférica, com prejuízos na hemodinâmica cardiovascular e no controle autonômico. Contudo, o TMV pode beneficemente atenuar as alterações autonômicas, com melhora na modulação parassimpática.

ABSTRACT

Introduction: Diabetes mellitus (DM) is one of the main chronic diseases that affects the population, being considered a serious public health problem. Ventilatory muscle training (VMT) has been shown to improve clinical outcomes in DM patients, however, little is known about its effect on some pathophysiological mechanisms of DM. Still, no study has verified the hemodynamic mechanisms, heart rate control and muscle variability promoted by VMT in DM. **Objectives:** To verify the effects of VMT on hemodynamics, heart rate variability (HRV) DM rats induced by streptozotocin infusion (STZ). **Study Design:** Animal experimental study. **Methods:** Thirty-six male Wistar rats were randomized into 4 groups: sham group - sedentary (Sham-ST; n = 9); sham group with VMT (Sham- VMT; n = 9); DM group - sedentary (DM-ST; n = 8) and DM group with VMT (DM- VMT; n = 8). Hemodynamics were assessed by central cannulation and HRV was calculated by ECG. In addition, muscle cross-sectional area of diaphragm, anterior tibial and soleus were verified. **Results:** Induction of DM by STZ resulted in weight loss, hyperglycemia, reduced blood pressure, increased HR and slower left ventricular contraction and relaxation ($P < 0.05$). We also observed a decrease in the RMSSD index, and in the cross-sectional area of the muscles, they showed a smaller area of muscle fibers in the diaphragm, soleus and anterior tibial muscles in diabetic rats ($P < 0.05$). Interestingly, however, TMV led to an attenuation of HR in healthy animals and an increase in RMSSD in diabetic rats ($P < 0.05$). **Conclusion:** The induction of DM produces profound deleterious changes in the diaphragmatic and peripheral muscles, with impairments in cardiovascular hemodynamics and in autonomic control. However, TMV can beneficially attenuate autonomic changes, with an improvement in parasympathetic modulation.

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp - Amplificador
Average RR - Média dos intervalos RR
bpm - Batimentos por minuto
C - Celsos
Ca²⁺ - Cálcio
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CM - Criótomo
Cols - Colaboradores
Corp - Corporal
DC - Duração do Ciclo
DD - Duração Diastólica
DM - Diabetes Mellitus
DP/dt - Contração ventricular
Dr. - Doudor
DS - Duração Sistólica
ECG - Eletrocardiograma
EUA - Estados Unidos da América
GLUT-4 - Glicose
HF - Alta frequência
IC - Insuficiência Cardíaca
ITP - Índice de tempo de pressão.
kg - Kilograma
LF - Baixa frequência
LF/HF - Relação baixa frequência/alta frequência
Max - Maxima
Median RR - Mediana dos intervalos RR
MG - Miligrama
Min - Mínimo
Min - Minutos
MM - Milímetro
mmHg - Milímetros de mercúrio
mV - Milivolt
mg/dl – Miligramas por decilitro
mg/kg – Miligrama por quilograma
N - Número de animais
NA - Neuropatia Autonômica
nu - Unidade normalizada
P - Peso
PDF - Pressão diastólica final
ph - Potencial hidrogeniônico
ph - Potencial hidrogeniônico
PI_{max} - Pressão Inspiratória Máxima
PM - Pressão Média
Prof - Professor
RMSSD - Raiz quadrada da média das diferenças sucessivas ao quadrado entre intervalos
SD1 -Desvio-padrão da variabilidade instantânea do intervalo batimento a batimento
SD2 - Variabilidade longo prazo dos intervalos RR contínuos
SDRR - Raiz quadrada da variância de toda a série temporal

ST - Sem treinamento
STZ - Estreptozotocina
TMV - Treinamento Muscular Ventilatório
USFCar - Universidade Federal de São Carlos
USA – United states of américa.
 μm - Micrômetro
V - Volt
VE - Ventrículo Esquerdo
VFC - Variabilidade da Frequência Cardíaca
 $\text{VO}_2\text{máx}$ - Máximo de Oxigênio
vs - Versos
X - Vezes
 β - Beta
& - E
X - Vezes
 α - Alfa

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. MEDIDA DE PESOS E GLICEMIAS DOS ANIMAIS.	26
TABELA 2. VARIÁVEIS HEMODINÂMICAS DERIVADAS DOS REGISTROS DAS PRESSÕES ARTERIAIS DOS ANIMAIS.	28
TABELA 3. VARIÁVEIS DA FUNÇÃO VENTRICULAR E PRESSÕES DAS CÂMARAS CARDÍACAS.	28
TABELA 4. VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA.	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.0
TABELA 5. ANÁLISE DA ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSA DOS MÚSCULOS DIAFRAGMA, SÓLEO E TIBIAL ANTERIOR.	311

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CILINDRO DE ACRÍLICO PARA O TREINAMENTO MUSCULAR VENTILATÓRIO DOS RATOS.	18
FIGURA 2. CANULAÇÃO DA ARTÉRIA CARÓTIDA DIREITA E POSICIONAMENTO DOS ELETRODOS.	19
FIGURA 3. AMPLIFICADOR DE SINAIS FE221 (<i>AD INSTRUMENTS BELLA VISTA, AUSTRALIA</i>)	20
FIGURA 4. SISTEMA INTERMEDIÁRIO DE SELO D'ÁGUA PRESSURIZADO, NECESSÁRIO PARA CALIBRAÇÃO DO SISTEMA E ADEQUADO REGISTRO DAS PRESSÕES.....	21
FIGURA 5. REGISTRO DAS CURVAS ATRAVÉS. CURVA EM VERMELHO MOSTRA REGISTRO DO ECG E CURVA EM AZUL O REGISTRO DA PRESSÃO VENTRICULAR ESQUERDA.	22
FIGURA 6. EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL E GLICEMIA DURANTE O PROTOCOLO .. ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	
FIGURA 7. COMPARAÇÃO DOS PESOS DO CORAÇÃO E MÚSCULOS ENTRE OS GRUPOS.....	27
FIGURA 8. COMPARAÇÃO DOS PESOS DA PRESSÃO SISTÓLICA, PRESSÃO DIASTÓLICA, PRESSÃO MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA ENTRE OS GRUPOS.....	28
FIGURA 9. COMPARAÇÃO DOS PESOS DA MAX DP/DT E IRP AVERAGE DP/DT ENTRE OS GRUPOS.	30
FIGURA 10. COMPARAÇÃO DO RMSSD ENTRE OS GRUPOS	31
FIGURA 11. COMPARAÇÃO DA ÁREA DA SECÇÃO TRANSVERSA DOS MÚSCULOS DIAFRAGMA, TIBIAL ANTERIOR E SÓLEO ENTRE OS GRUPOS.....	32
FIGURA 12. COMPARAÇÃO DA ÁREA DA SECÇÃO TRANSVERSA DO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR.	32
FIGURA 13. COMPARAÇÃO DA ÁREA DA SECÇÃO TRANSVERSA DOS MÚSCULOS TIBIAL ANTERIOR E SÓLEO ENTRE OS GRUPOS.	33
FIGURA 14. COMPARAÇÃO DA ÁREA DA SECÇÃO TRANSVERSA DOS MÚSCULOS DIAFRAGMA, TIBIAL ANTERIOR E SÓLEO.....	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Impacto da diabetes na função cardiovascular e na musculatura periférica e nos músculos ventilatórios.	10
1.2. Indução da DM pela Estreptozotocina	12
1.3. Efeitos do treinamento muscular ventilatório na DM	13
2. OBJETIVO	15
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Aspectos éticos e animais	16
3.2. Grupos Experimentais	16
3.3. Indução ao Diabetes Mellitus.....	16
3.4. Protocolo de Treinamento Muscular Ventilatório	17
3.5. Canulação dos animais e colocação dos eletrodos de eletrocardiograma	18
3.5.1. Registro de pressão arterial e de pressão ventricular esquerda.....	19
3.6. Análises das pressões.....	22
3.6.1. Análise da pressão arterial.....	22
3.6.2. Análise da pressão ventricular esquerda	22
3.7. Análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC).	23
3.8. Histologia Muscular.....	23
3.8.1. Coleta e armazenamento	23
3.8.2. Processamento histológico dos músculos tibial anterior, sóleo e diafragma.....	24
3.9. Cálculo de Tamanho da Amostra e Análise Estatística.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Alterações da massa corporal	25
4.2. Alterações Hemodinâmicas.....	27
4.3. Alterações da Variabilidade da Frequência Cardíaca	30
4.4. Alterações Histológicas das fibras musculares.....	31
5. DISCUSSÃO	35
5.1. Principais achados do estudo	35
5.2. Efeitos da estreptozotocina para induzir a DM em ratos	35
5.3. Efeitos do TMV	37
5.4. Efeitos do TMV em ratos diabéticos	38

6. CONCLUSÃO.....	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Error! Bookmark not defined.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Impacto da diabetes na função cardiovascular e na musculatura periférica e nos músculos ventilatórios.

A Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio do metabolismo de carboidratos, que apresenta dentre outros sintomas, a hiperglicemia. A DM apresenta duas principais classes clínicas: A DM tipo I e II. A DM do tipo I é caracterizada pela destruição autoimune de células β nas ilhotas de *Langerhans* no pâncreas, que são as responsáveis pela produção de insulina. Já a DM do tipo II é definida pela resistência de células alvo à insulina (OLIVEIRA, 2006). O sobrepeso e a obesidade associados ao estilo de vida sedentário são alguns fatores que contribuem para a incidência de DM (FINUCANE e cols., 2011), principalmente a adiposidade central combinada ao sedentarismo em populações jovens (MATTEI e cols., 2015).

A DM é uma das doenças mais prevalentes no mundo, e tem-se observado aumento importante da morbidade e mortalidade associadas a esta doença (WILD e cols., 2004). Em 2012 estimou-se que 1,5 milhões de mortes tiveram como causa direta a diabetes, sendo que 80% das mortes foram em países de baixa ou média renda (World Health Organization, 2014). O *Diabetes Health Economics Study Group*, que pertence à Federação Internacional de Diabetes, projetou para o ano de 2025 que cerca de 300 milhões de pessoas no mundo serão portadoras de DM (OLIVEIRA, 2006).

Do ponto de vista cardiovascular, a DM constitui um forte fator de risco para doenças como hipertensão, aterosclerose, cardiomiopatia, insuficiência cardíaca (IC), neuropatia e retinopatia. É considerado um fator de risco independente para o desenvolvimento de coronariopatia, e o sistema nervoso periférico está frequentemente

comprometido nesses pacientes (PICKUP & WILLIAMS, 1994; RICHARD & RICHARD, 1992).

A neuropatia autonômica (NA) é uma complicação que afeta a modulação autonômica, reduzindo a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) (FAZAN e cols., 1997). A disfunção simpática cardíaca em portadores de DM envolve a deservação (distal) e hiperinervação (proximal) do ventrículo esquerdo, causando arritmias, por alterar a estabilidade elétrica ou comprometer o fluxo sanguíneo do miocárdio (STEVENS e cols., 1998). Por essa razão a NA está associada à alta morbidade e mortalidade nesses pacientes (EWING e cols., 1980).

Adicionalmente, alterações musculares periféricas estão presentes pela miopatia diabética, causando prejuízo ao tecido muscular, através de rupturas de sarcômeros, distúrbios no metabolismo do Ca^{2+} , diminuição da capacidade oxidativa do músculo, aumento do lipídeo intramuscular, diminuição da síntese proteica, aumento da proteólise e perda da capacidade de regeneração e reparo do tecido muscular devido à má funcionalidade das células satélites (KRAUSE e cols., 2010; JEONG e cols., 2013). A insulina promove o crescimento e manutenção da massa muscular, pois é por meio dela que estão envolvidos os processos de síntese proteica e de inibição da proteólise. A insulina é um hormônio com características anabólicas, sendo que os níveis de glicose e aminoácidos presentes no sangue controlam a sua síntese (DALL'AGO e cols., 2002). A síntese proteica é favorecida pela ação da insulina no processo celular por interação com receptores de membrana (SMITH, 2003; BORTOLOTTI, 2007) e transportadores de glicose (GLUT-4), que facilitam a entrada do carboidrato para a célula (MUECKLER, 1994; AUGUSTIN, 2010). A síndrome da DM pode levar a insulinopenia diabética, onde ocorre um desequilíbrio entre a síntese e degradação proteica, interferindo assim, no metabolismo de carboidratos e proteínas do músculo

(ROGATTO & LUCIANO, 2001; CARVALHEIRA e cols., 2002, KIMBALL e cols., 1994), acarretando em perda de massa muscular, que resulta em prejuízo funcional, com redução da capacidade física e da força muscular (ANDERSEN e cols., 1996; ANDERSEN, 1997; ANDERSEN e cols., 2005).

1.2. Indução da DM pela Estreptozotocina

Para melhor compreensão das consequências cardiovasculares, metabólicas e musculares da DM o modelo experimental vem sendo amplamente utilizado (ROSSINI, 2004). A estreptozotocina (STZ) é a principal droga utilizada para a indução do DM para investigação do sistema cardiovascular, apesar da controvérsia por seus sintomas se assemelharem tanto ao diabetes tipo I como o tipo II (ELEAZU e cols., 2013).

Em ratos diabéticos induzidos por STZ foi observado redução da frequência cardíaca e função diastólica prejudicada, que são manifestações precoces de doenças cardíacas em pacientes humanos (FROM e cols., 2010).

A cardiomiopatia diabética está associada à disfunção do ventrículo esquerdo (VE) em pacientes diabéticos, e as características observadas em modelos de ratos diabéticos induzidos por STZ e humanos são de acúmulo de lipídios, estresse oxidativo, comprometimento mitocondrial e morte celular de cardiomiócitos (KO e cols., 2009; SHIMADA e cols., 2012; FRUSTACI e cols., 2000; ZHANG e cols., 2015).

Adicionalmente, a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) está reduzida em pacientes com DM quando comparados com indivíduos saudáveis sem intolerância à glicose (PIKKUJÄMSÄ e cols., 1998; SMITH, 1982). Li e cols. (2015) realizaram um estudo de 10 semanas, analisando os índices da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) em ratos normais e ratos diabéticos por STZ que demonstrou um aumento da modulação simpática.

A redução da VFC é considerada um indicador prévio de NA (ZIEGLER, 1999). A NA envolve dano progressivo ao sistema nervoso simpático e parassimpático, levando a alterações na eletrofisiologia do miocárdio (FROM e cols., 2010).

Estudos mostram que diabéticos podem apresentar disfunção no músculo diafragma por acometimento do nervo frênico, levando a diminuição da condução nervosa (YESIL e cols., 2013; KABITZ e cols., 2008), e no modelo animal, pode-se observar atrofia axonal e perda de mielina (RODRIGUES FILHO & FAZAN, 2006).

1.3. Efeitos do treinamento muscular ventilatório na DM

Dentre as ferramentas não farmacológicas utilizadas como coadjuvantes ao tratamento de doenças do sistema cardiovascular e respiratório, tem-se o treinamento muscular ventilatório (TMV). O TMV tem sido extensivamente estudado pelo seu potencial efeito da força e *endurance* dos músculos inspiratórios, buscando a redução do esforço ventilatório, principalmente durante o exercício, além disso, é capaz de incrementar a capacidade funcional verificada pelo aumento do consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) (SAMPAIO e cols., 2002).

O TMV em pacientes com DM demonstrou aumentar a força muscular inspiratória, verificada pela pressão inspiratória máxima ($P_{Imáx}$), além de aumentar a espessura do músculo diafragma (KAMINSKI e cols., 2015). Outros estudos também apontam para uma melhora na capacidade funcional e da pressão arterial (FERREIRA e cols., 2013). Em um estudo desenvolvido por Silva e cols. (2013) os autores verificaram que o TMV em idosos com resistência a insulina, resultou no aumento da proteína GLUT4, um importante transportador celular de glicose. Adicionalmente o TMV em ratos com IC promoveu a melhora da função hemodinâmica, e da atividade simpátovagal (JAENISCH e cols., 2011).

Contudo, apesar de alguns estudos terem demonstrado benefícios no efeito da função hemodinâmica e VFC em ratos com IC (JAENISCH e cols., 2011), pouco é conhecido sobre os efeitos promovidos pelo TMV em ratos com DM. Por tanto, a hipótese inicial deste trabalho foi de que o modelo de DM em ratos poderá induzir modificações tanto centrais quanto periféricas, e que o TMV possivelmente promoverá melhora na função hemodinâmica, VFC e músculos periféricos. Ademais, esse estudo pode contribuir com a literatura com informações a respeito dos efeitos do TMV sobre os aspectos fisiopatológicos da DM no modelo com STZ.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de um protocolo do TMV de 6 semanas, sobre a função hemodinâmica, a variabilidade da frequência cardíaca e os músculos periféricos e diafragma em ratos com e sem diabetes por STZ.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar o efeito do TMV, em ratos com e sem DM, sobre a função hemodinâmica.

Analisar as respostas autonômicas cardíacas de ratos com e sem DM, após o protocolo de TMV.

Verificar o efeito do TMV no diafragma e nos músculos periféricos em ratos com e sem DM.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos e animais

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSCar sob o parecer número 1778140618. O manejo dos animais obedeceu ao disposto na Lei nº 11.794 de 08/10/2008, na Lei nº 6.899 de 15/07/2009, na Resolução nº 879 de 15/02/2008 (CFMV) e nas demais normas aplicáveis a utilização de animais para ensino e pesquisa, especialmente nas resoluções do CONCEA. Para o desenvolvimento deste estudo foram solicitados 36 ratos *Wistar* machos, provenientes do biotério da UFSCar, com aproximadamente 90 dias de idade e com peso entre 170 e 270g.

Os animais foram mantidos em caixas plásticas com medidas de 270 x 260 x 310 mm, em grupos de no máximo três animais por caixa, em ambiente com temperatura controlada (21°C) e ciclo “claro-escuro” de 12 horas. Água e ração comercial foram oferecidas *ad libitum*.

3.2. Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais com 9 animais cada:

Grupo 1 - Animais *Sham* e com TMV (Sham TMV);

Grupo 2 - Animais *Sham* e sem TMV (Sham ST)

Grupo 3 - Animais com DM e com TMV (DM TMV)

Grupo 4 - Animais com DM e sem TMV (DM ST).

3.3. Indução ao Diabetes Mellitus

Antes da indução da diabetes, foram registrados valores basais de glicemia e peso dos ratos uma vez por semana, durante duas semanas. Após um jejum de 12 horas,

os ratos induzidos à DM receberam uma única injeção intraperitoneal de 50 mg/kg de massa corporal, de estreptozotocina - STZ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), a qual foi diluída em 1mL de tampão de citrato de sódio (pH 4.5). Enquanto que, os ratos dos grupos 1 e 2, receberam injeções com volume igual de solução veículo (citrato de sódio, pH 4,5). A DM foi verificada no quinto dia após a injeção de STZ e confirmada o estado hiperglicêmico quando a glicose no sangue foi > 250 mg/dL (DUTRA e cols., 2012). A glicemia foi determinada através de sangue da cauda, utilizando um glicosímetro portátil (Accu-Check; Roche Diagnóstico, Indianapolis, IN, EUA). O peso corporal e a glicemia dos animais foram aferidos semanalmente.

3.4. Protocolo de Treinamento Muscular Ventilatório

Após uma semana da indução ou não de DM nos respectivos grupos, os ratos passaram por um condicionamento para respirar através de um orifício conectado a um cilindro de acrílico, como demonstra a figura 1. O condicionamento permitiu adaptação dos animais dentro do cilindro, buscando adequada posição da cabeça na extremidade anterior do equipamento (cone), por onde foi realizada a resistência durante a respiração, tornando o treinamento efetivo (JAENISCH e cols., 2011).

Após o condicionamento, os animais que realizaram o protocolo de TMV foram alocados aleatoriamente para um dos dois grupos de TMV, com DM ou *sham*. O protocolo de TMV foi realizado durante o período noturno, 30min/dia, 5 dias/semana, durante 6 semanas. A carga oferecida, para que houvesse o treinamento da musculatura ventilatória, foi gerada por meio de um orifício, acoplado em um cilindro de acrílico, com diâmetro inicial de 0,8 mm. Ao término da primeira semana, o diâmetro foi reduzido para 0,7 mm, e nas próximas semanas para 0,6 mm, 0,55 mm, 0,45 mm, sendo 0,3 mm final, impondo máxima resistência ao treinamento (BISSCHOP e cols., 1997;

JAENISCH e cols., 2011), (Figura 1). O grupo sem TMV passou pelo mesmo condicionamento, porém sem resistência.



Figura 1. Cilindro de acrílico para o treinamento muscular ventilatório dos ratos.

3.5. Canulação dos animais e colocação dos eletrodos de eletrocardiograma

Após o término do período do protocolo de TMV ou sem TMV, os animais foram pesados e anestesiados com cloridrato de ketamina (80 mg/kg) e cloridrato de xilazina (12 mg/kg) por via intraperitoneal e avaliados quanto a função hemodinâmica e autonômica. Os animais foram posicionados em uma plataforma aquecida e então foram colocados 3 eletrodos na região subcutânea, o positivo e negativo (proximal) na região do peitoral e o neutro (distal) na região anterior da pata direita para registro do eletrocardiograma (ECG) como ilustrado na Figura 2. O registro do ECG foi realizado durante os 5 minutos iniciais, quando então foi iniciada a canulação da artéria carótida direita. Um cateter de polietileno (PE50) foi utilizado para canulação dos animais para registros das pressões arterial e ventricular (**Figura 2**) (RODRIGUES, 2008).



Figura 2. Canulação da artéria carótida direita e posicionamento dos eletrodos.

3.5.1. Registro de pressão arterial e de pressão ventricular esquerda

Para registro das pressões arterial e ventricular foi utilizado um sistema de aquisição de dados (*PowerLab 8/35 Pro AD Instruments, Bella Vista, Australia*), conectado a um amplificador de sinais (*Bridge Amp FE221 AD Instruments Bella Vista, Australia*) (**Figura 3**).



Figura 3. Amplificador de Sinais FE221(ADInstruments Bella Vista, Australia).

No sistema de aquisição os dados foram registrados a 1000 pontos por segundo, sendo, configurado com os seguintes parâmetros: O canal 1 para o ECG: com sample rate a 1k/s, range a 5 mV, ligado ao *Bio Amplifier e Units* em mV; O canal 2 para as medidas de pressões: com sample rate a 1k/s, range a 50 mV, ligado ao *Bridge Amplifier e Units* em mmHg; E o canal 3 com uma derivação do canal 2 para FC: com sample rate a 1k/s, range a 2 mV, liga ao *Input Amplifier e Units* em V. Um transdutor de pressão (*MLT844; AD Instruments, Bella Vista*) foi conectado com uma de suas extremidades no amplificador de sinais e outra extremidade foi acoplada a um sistema intermediário de selo d'água pressurizado, necessário para calibração do sistema e adequado registro das pressões (**Figura 4**). A calibração das pressões foi realizada através de um manômetro de pressão, sendo registradas duas pressões, uma em 0 mmHg e outra em 250 mmHg.



Figura 4. Sistema intermediário de selo d'água pressurizado, necessário para calibração do sistema e adequado registro das pressões.

Após introdução da cânula na carótida direita foram registrados 5 minutos da pressão arterial central e então a cânula foi sendo introduzida e posicionada no ventrículo esquerdo (VE) e a pressão ventricular foi registrada também durante 5 minutos. A posição da cânula foi determinada pela observação da característica de onda de pressão ventricular (RODRIGUES, 2008) (**Figura 5**).

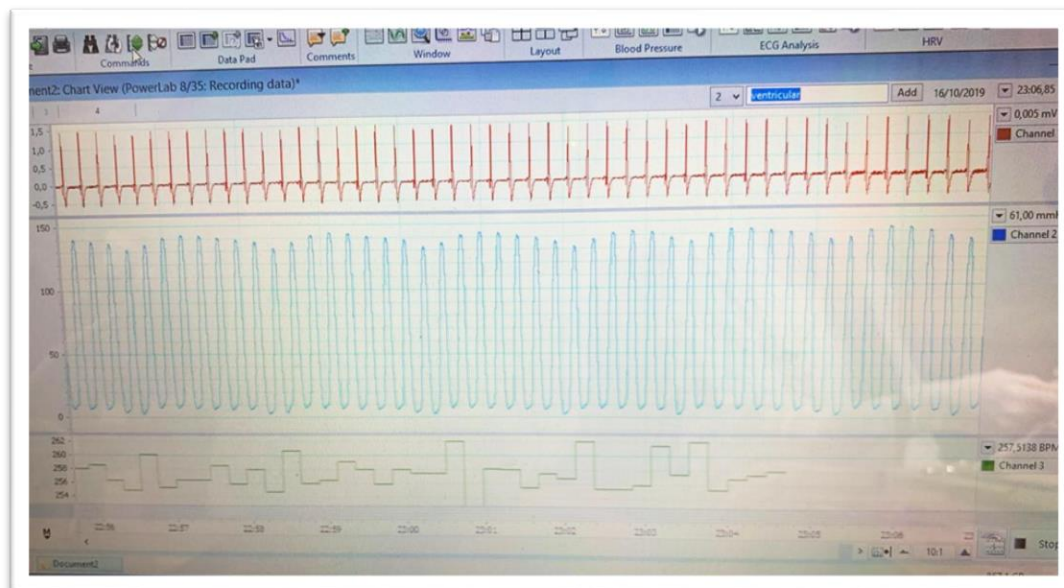


Figura 5. Registro das curvas. Curva em vermelho mostra registro do ECG e curva em azul o registro da pressão ventricular esquerda.

3.6. Análises das pressões

3.6.1. Análise da pressão arterial

As pressões arteriais foram determinadas utilizando-se programa labchart 8 (*AD Instruments Bella Vista, Australia*) (SOUZA., 2008). Este programa permitiu a detecção das curvas de pressão batimento a batimento, onde, foram analisadas em um período de 5 min, fornecendo os valores das seguintes variáveis: pressão sistólica, pressão diastólica, pressão dicrótica, pressão média, pressão de pulso, duração da ejeção, duração da não ejeção, duração do ciclo, frequência cardíaca, hora do pico, pressão diastólica média (RODRIGUES, 2008).

3.6.2. Análise da pressão ventricular esquerda

As pressões ventriculares foram determinadas utilizando-se programa labchart 8 (*AD Instruments Bella Vista, Australia*) (SOUZA., 2012) . Este programa permitiu a detecção das curvas de pressão batimento a batimento, sendo analisadas em um período

de 5 min, fornecendo os valores das seguintes variáveis: Pressão Máxima; Pressão Mínima; Pressão diastólica final; Pressão Média; Pressão Máxima-Mínima; Duração Sistólica; Duração Diastólica; Duração do Ciclo; Frequência Cardíaca; Contração ventricular; Período de relaxamento isovolumétrico; Índice de tempo de pressão (RODRIGUES, 2008).

3.7. Análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC).

A análise foi feita utilizando-se o programa labchart 8 (*AD Instruments Bella Vista, Austrália*) associado ao sistema de aquisição de dados (SOUZA., 2012);. As seguintes variáveis de VFC foram analisadas em um período de 5 minutos, considerando os trechos de aquisição mais estáveis, por análise visual gráfica: métodos lineares no domínio do tempo: frequência cardíaca (FC); média dos intervalos RR (*Average RR*); mediana dos intervalos RR (*Median RR*); raiz quadrada da variância de toda a série temporal (SDRR) (PAOLILLO e cols., 2014); raiz quadrada da média das diferenças sucessivas ao quadrado entre intervalos RR adjacentes (RMSSD). No domínio da frequência: baixa frequência (LF (nu)), alta frequência (HF (nu)), relação baixa frequência/alta frequência (LF/HF) (SOUZA e cols., 2012); Dados não lineares: o desvio-padrão da variabilidade instantânea do intervalo batimento a batimento (SD1) e a variabilidade longo prazo dos intervalos RR contínuos (SD2) (BASSI e cols., 2018).

3.8. Histologia Muscular

3.8.1. Coleta e armazenamento

Após a medida da hemodinâmica e da VFC, os animais foram eutanasiados por meio de infusão endovenosa de uma overdose de anestésico pentobarbital (180mg/kg). Após a eutanásia, os músculos diafragma, sóleo e tibial anterior foram dissecados,

pesados e congelados em nitrogênio líquido. Os três músculos foram armazenados em freezer à -80°C (GIGO-BENATO e cols., 2010).

3.8.2. Processamento histológico dos músculos tibial anterior, sóleo e diafragma.

Cortes transversos do ventre muscular, com espessura de 10 μm , foram realizados em criostato (CM 1850 UV (LEICA®), à uma temperatura de -30°C. Os cortes foram corados com Azul de Toluidina e analisados em microscopia de Luz (*Axiovision 3.0.6 SP4 - Carl Zeiss of the Alemanha*). Quatro microfotografias foram realizadas na porção central das secções com aumento de 20X. As áreas de seção transversa de 100 fibras foram manualmente medidas, de forma aleatória, por um avaliador cego para o grupo experimental, usando o *software Image J, versão 1.43u, National Institutes of Health, EUA*. Os dados foram expressos em micrômetros quadrados (GIGO-BENATO e cols., 2010).

3.9. Cálculo de Tamanho da Amostra e Análise Estatística

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado utilizando o software Gpower, de acordo com a variável HF do estudo de Jaenisch e cols. (2016), para atingir um poder estatístico de 80% ($\beta = 0,20$), com $\alpha = 0,05$, foram necessário um mínimo de 8 ratos para cada grupo, porém considerando uma perda de 10% para cada grupo, consideramos um N amostral de 9 para cada grupo. Os dados foram analisados usando o software SigmaPlot (Systat, USA, 2011), foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e apresentado descritivamente como média e desvio padrão (paramétrico) ou como mediana e intervalo mínimo e máximo (não paramétrico). Para comparar os efeitos entre os grupos e a intervenção, foi aplicado o teste de ANOVA on-way, seguido *post hoc de Tukey*. Foi considerado um $p < 0,05$ significativo.

4. RESULTADOS

O TMV foi iniciado com 36 animais, e durante as 6 semanas de treinamento, houve perda de 2 animais, um animal no grupo DM TMV mantendo 8 animais e um animal no grupo de DM ST mantendo 8 animais, os grupos Sham com TMV e Sham ST mantiveram 9 animais em cada grupo do início ao fim.

4.1. Alterações da massa corporal

A seguir estão apresentados os resultados do peso dos animais, dos músculos e do coração, bem como da glicemia basal (tabela 1). Observamos que a DM produziu profunda redução do peso do coração em comparação a todos os demais grupos ($P < 0,05$), ressalta-se que no grupo que DM que realizou TMV, o peso do coração foi maior do que no grupo DM sem o treinamento ($P < 0,05$) (figura 7).

Além disso, a DM também reduziu o peso dos músculos diafragma, sóleo e tibial anterior quando comparado aos demais grupos ($P < 0,05$). Contudo, o TMV não foi capaz de atenuar a redução do peso muscular do diafragma, do sóleo e do tibial anterior em comparação ao DM sem o TMV ($P > 0,05$) (figura 7).

Tabela 1. Medida de pesos e glicemias dos animais.

Grupos N	Sham TMV 9	Sham ST 9	DM TMV 8	DM ST 8
P. Corp. Inicial (g)	181,4±9,0	186,4±8,3	182,8±17,1	175,8±22,5
P. Corp. Pos-indução(g)	244,7±15,6	249,2±9,7	217,3±30,6	222,8±26,2
P. Corp. Pos-TMV (g)	418,0±32,4	410,5±27,0	324,2±62,7 ^{εα}	319,1±69,0 ^{#*}
Glicose basal (mg/dl)	130,4±7,1	131,5±20,7	127,7±11,5	127,6±15,9
Glicose Pos-indução(g)	119,4±36,3	136,7±21,4	488,7±132,1 ^{εα}	460,0±73,9 ^{#*}
Glicose Pos-TMV (mg/dl)	109,7±9,3	111,6±13,9	477,0±149,6 ^{εα}	451,3±100,4 ^{#*}
P. do Coração (g)	1,5±0,1	1,4±0,08	1,3±0,1	1,2±0,2 ^{#†}
P. do Diafragma (g)	0,8±0,09	0,8±0,08	0,6±0,1 ^{εα}	0,5±0,1 ^{#*}
P. do Sóleo (g)	0,2±0,04	0,2±0,03	0,1±0,03 ^α	0,1±0,03 [#]
P. do Tibial Anterior (g)	0,7±0,04	0,8±0,1	0,5±0,1 ^{εα}	0,5±0,1 ^{#*}

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão; N: número de animais; TMV: treinamento muscular ventilatório; ST: sedentário; DM: diabetes mellitus; P.: peso; Corp.: corporal.

Diferença entre Sham TMV vs. DM ST; P<0,005;

* Diferença entre Sham ST vs. DM ST; P<0,005;

† Diferença entre DM TMV vs. DM ST; P<0,005;

ε Diferença entre SHAM ST vs. DM TMV; P<0,005;

α Diferença entre SHAM TMV vs. DM TMV, P<0,005.

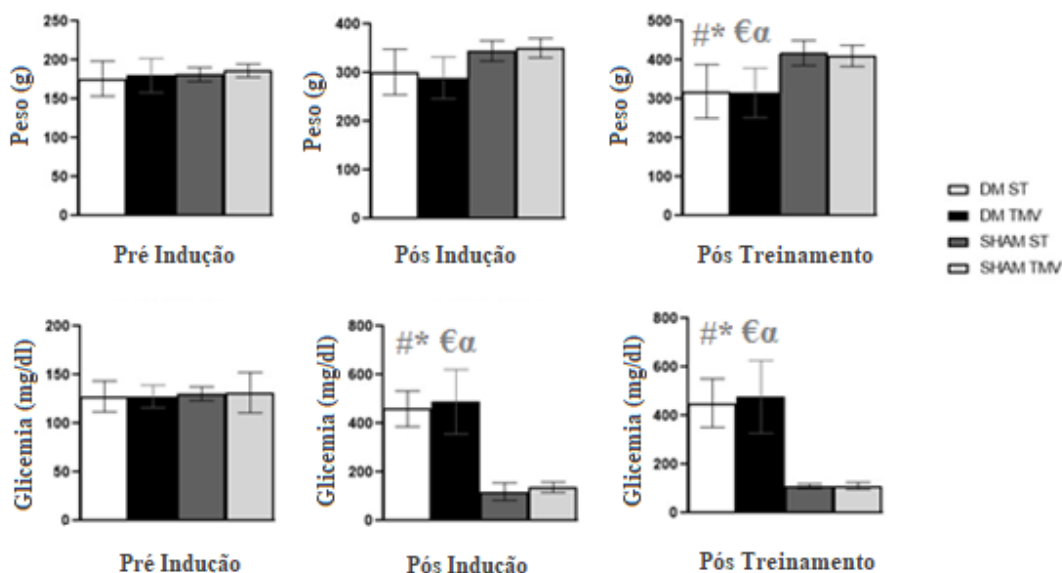


Figura 6. Evolução do peso corporal e glicemia durante o protocolo (# Diferença entre Sham TMV vs. DM ST; P<0,005; * Diferença entre Sham ST vs. DM ST; P<0,005; ε Diferença entre SHAM ST vs. DM TMV; P<0,005; α Diferença entre SHAM TMV vs. DM TMV, P<0,005).

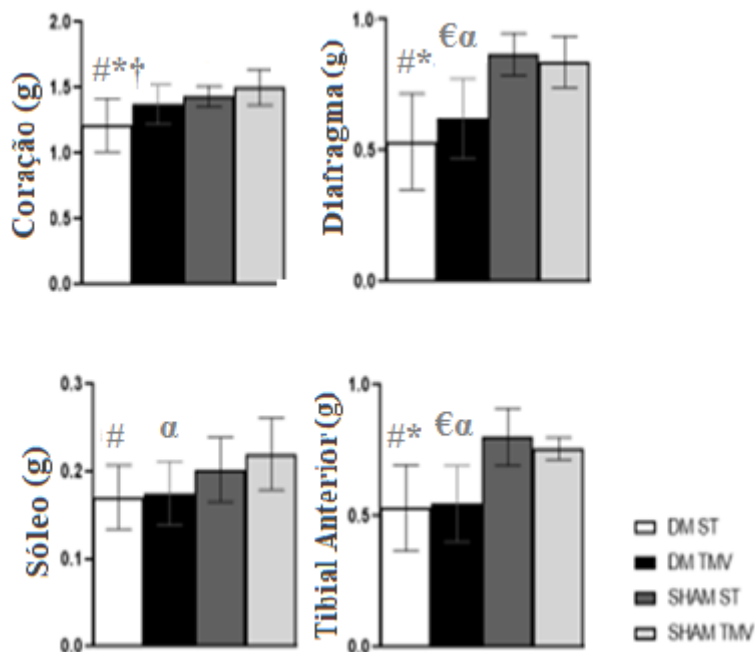


Figura 6. Comparação dos pesos do coração e músculos entre os grupos (# Diferença entre Sham TMV vs. DM ST; $P < 0,005$; * Diferença entre Sham ST vs. DM ST; $P < 0,005$; † Diferença entre DM TMV vs. DM ST; $P < 0,005$; € Diferença entre SHAM ST vs. DM TMV; $P < 0,005$; α Diferença entre SHAM TMV vs. DM TMV, $P < 0,05$).

4.2. Alterações Hemodinâmicas

As derivadas (canal 3) do registro da pressão arterial dos ratos apresentaram uma pressão sistólica menor em ratos DM sem treinamento quando comparado ao grupo sham com ou sem treinamento ($P < 0,05$). A pressão diastólica e média, também apresentaram valores significativamente menores no grupo DM sem treinamento quando comparados aos ratos sham treinado ($P < 0,05$). O grupo DM treinados não apresentou diferença em relação aos outros grupos. Em relação à frequência cardíaca, esta apresentou-se maior nos ratos com DM e Sham sem treinamento quando comparado aos Sham treinados ($P < 0,05$) (figura 8).

Tabela 2. Variáveis Hemodinâmicas derivadas dos registros das pressões arteriais dos animais.

Grupos N	Sham TMV 9	Sham ST 9	DM TMV 8	DM ST 8
Pressão Sistólica (mmHg)	133,06±22,4	129,8±12,8	114,7±23,2	109,5±13,08 ^{#*}
Pressão Diastólica (mmHg)	106,7±18,6	103,9±14,1	85,2±17,8	79,3±17,2 [#]
Pressão Dicrotica (mmHg)	114,7±21,0	103,1±22,7	93,4±23,07	86,2±18,9
Pressão Média (mmHg)	120,9±19,9	117,4±13,5	99,9±20,01	94,9±14,8 [#]
Pressão de Pulso (mmHg)	26,2±5,7	25,8±5,5	29,4±7,8	30,2±11,3
Duração da Ejeção (s)	1,004±0,8	0,6±0,5	0,5±0,3	0,4±0,2
Duração da não Ejeção (s)	0,6±0,5	0,6±0,5	0,3±0,2	0,3±0,1
Duração do Ciclo (s)	0,9±1,1	0,4±0,3	0,3±0,06	0,3±0,1
Frequência Cardíaca (bpm)	141,1±67,4	202,1±39,4 ^{&}	190,7±36,5	198,7±32,4 [#]
Hora do Pico (s)	0,3±0,4	0,1±0,1	0,09±0,03	0,08±0,03
Pressão Diastólica Média (mmHg)	118,5±17,3	105,9±26,2	95,6±18,09	93,3±15,2

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão; N: número de animais; TMV: treinamento muscular ventilatório; ST: sedentário ; DM: diabetes mellitus.

[#] Diferença entre Sham TMV vs. DM ST; P<0,005;

^{*} Diferença entre Sham ST vs. DM ST; P<0,005;

[&]Diferença entre Sham TMV vs. Sham ST; P<0,005.

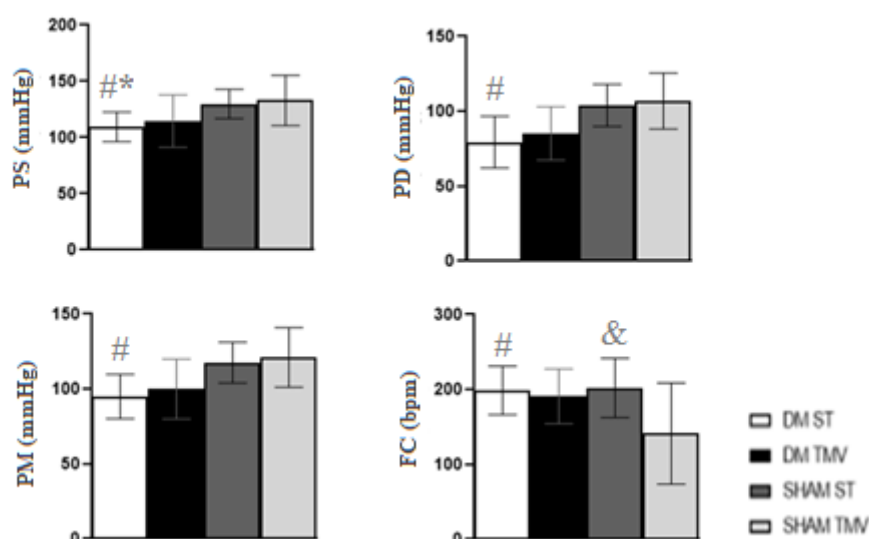


Figura 7. Comparação dos pesos da pressão sistólica (PS), pressão diastólica (PD), pressão média (PM) e frequência cardíaca (FC) entre os grupos. (# Diferença entre Sham TMV vs. DM ST; P<0,005; * Diferença entre Sham ST vs. DM ST; P<0,005; & Diferença entre Sham TMV vs. Sham ST; P<0,005).

Quanto à função ventricular, foi observado um período maior de contração do ventrículo esquerdo nos ratos com DM sem treinamento quando comparados aos Sham treinados ($P < 0,05$), e um período maior de relaxamento dos ratos DM sem treinamento com relação aos Sham treinados ou não ($P < 0,05$) (figura 9).

Tabela 3. Variáveis da função ventricular e pressões das câmaras cardíacas.

Grupos N	Sham TMV 9	Sham ST 9	DM TMV 8	DM ST 8
P Máx (mmHg)	114,3±28,4	106,09±30,9	101,9±20,6	116,5±22,1
P Mín (mmHg)	13,2±8,7	10,3±6,5	10,001±7,1	7,8 ±6
PDF(mmHg)	15,6±8,6	13,08±5,2	16,1±8,6	14,2±4,7
PM (mmHg)	51,9±13,3	48,1±12,7	47,9±7,1	54,8±7,4
P Max-Min (mmHg)	101,1±27,4	95,7±31,9	91,9±27,7	108,6±26,2
DS (s)	0,1±0,02	0,1±0,01	0,1±0,01	0,1±0,02
DD (s)	0,1±0,03	0,1±0,03	0,1±0,06	0,2±0,03
DC (s)	0,2±0,05	0,2±0,04	0,3±0,07	0,2±0,03
FC (bpm)	216,7±40,9	226,3±37,9	207,8±41,1	211,4±26,9
Max dP/dt (mmHg/s)	2233,009±929,5	2760,4±1261,4	2771,9±1176,9	3989,07±769,6 [#]
Min dP/dt (mmHg/s)	-1105,3±540,4	-1167,6±651,6	-1370,6±463,1	-1982,9±547,3 ^{#*}
Tau (s)	0,04±0,008	0,05±0,02	0,2±0,3	0,06±0,1
ITP (mmHg)	10,5±3,3	9,7±3,1	10,9±2,09	13,2±3,2

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão; N: número de animais; TMV: treinamento muscular ventilatório; ST: sedentário; DM: diabetes mellitus; P Máx: Pressão Máxima; P Mín: Pressão Mínima; PDF: Pressão diastólica final; PM: Pressão Média; P Max-Min: Pressão Máxima-Mínima; DS: Duração Sistólica; DD: Duração Diastólica; DC: Duração do Ciclo; FC: Frequência Cardíaca; Max dP/dt: contração ventricular ; Min dP/dt: período de relaxamento ventricular; ITP: Índice de tempo de pressão.

[#] Diferença entre Sham TMV vs. DM ST; $P < 0,005$;

* Diferença entre Sham ST vs. DM ST; $P < 0,005$.

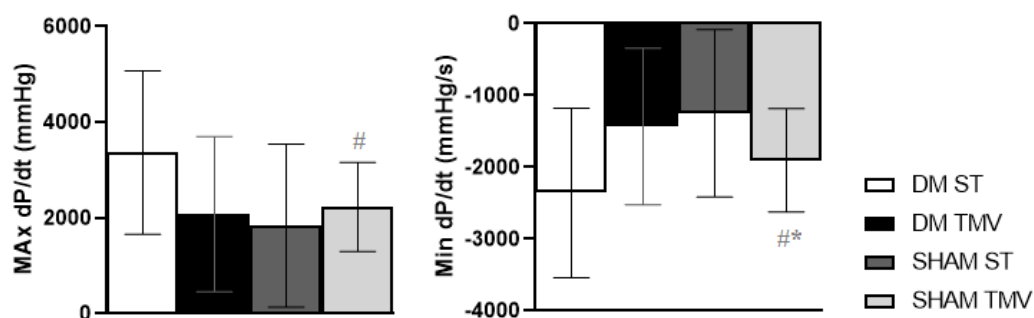


Figura 8. Comparação dos pesos da Max dP/dt e IRP Average dP/dt entre os grupos (#Diferença entre Sham TMV vs. DM ST; $P<0,005$; * Diferença entre Sham ST vs. DM ST; $P<0,005$).

4. 3. Alterações da Variabilidade da Frequência Cardíaca

No sistema autonômico cardíaco, foi observado pelo índice do RMSSD que os ratos Sham TMV e os diabéticos treinados apresentaram uma melhor atuação do nervo vago, comparado aos animais diabéticos sem treinamento ($P<0,05$) (figura 10).

Tabela 4. Variabilidade da Frequência Cardíaca

Grupos	Sham TMV	Sham ST	DM TMV	DM ST
N	9	9	8	8
FC (bpm)	219,5±46,4	212,1±29,7	196,7±35,8	210,5±33,5
Average RR (ms)	299,8±54,1	291,4±45,8	317,2±42,6	295,1±40,4
Median RR (ms)	311,7±50,1	287,6±47,5	316,5±40,5	295,1±35,04
SDRR (ms)	44,7±30,1	25,2±15,5	26,5±21,7	22,7±16,6
RMSSD (ms)	24,01±12,6	16,7±10,9	20,6±14,1	7,9±5,8 ^{#†}
BF (nu)	19,9±10,7	20,8±14,3	16,6±6,6	16,07±8,2
AF (nu)	62,2±9,9	57,3±14,4	61,3±11,1	58,05±15,7
BF/AF	0,3	0,2	0,3	0,2
SD1 (ms)	15,9	13,02	12,1	6,8
SD2 (ms)	53,3	43,4	29,5	22,9

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão; N: número de animais; TMV: treinamento muscular ventilatório; ST: sem treinamento; DM: diabetes mellitus.; FC: frequência cardíaca; Average RR: média dos intervalos RR; Median RR: mediana dos intervalos RR; SDRR: raiz quadrada da variância de toda a série temporal; RMSSD: raiz quadrada da média das diferenças sucessivas ao quadrado entre intervalos RR adjacentes; BF: baixa frequência; AF: alta frequência, BF/AF: relação baixa frequência/alta frequência; SD1: desvio-padrão da variabilidade instantânea do intervalo batimento a batimento; SD2: a variabilidade longo prazo dos intervalos RR contínuos.

[#] Diferença entre Sham TMV vs. DM ST; $P<0,005$;

[†] Diferença entre DM TMV vs. DM ST; $P<0,005$.

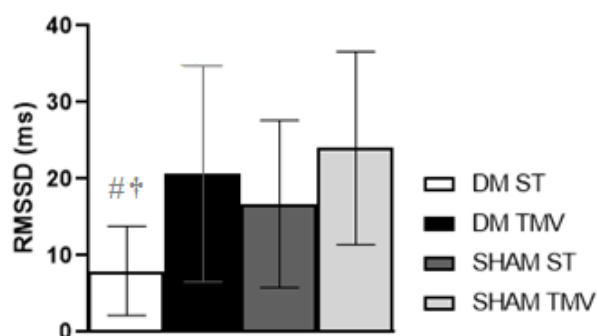


Figura 10. Comparação do RMSSD entre os grupos (# Diferença entre Sham TMV vs. DM ST; $P < 0,005$; † Diferença entre DM TMV vs. DM ST; $P < 0,005$).

4.4. Alterações Histológicas das fibras musculares

Podemos observar que os músculos diafragma, tibial anterior e sóleo dos ratos com DM sem treinamentos apresentaram uma menor área de secção transversa comparada aos ratos Sham sem treinamento ($P < 0,05$). O tibial anterior e o Sóleo dos ratos com DM treinados, também apresentaram uma menor área de secção transversa quando comparados ao Sham sem treinamento ($P < 0,05$). Além disso, o tibial anterior dos ratos DM treinados quando comparado aos ratos Sham treinados também apresentou uma menor área de secção transversa ($P < 0,05$) (figura 11).

Tabela 4. Análise da área de secção transversa dos músculos Diafragma, Sóleo e Tibial Anterior.

Grupos N	Sham TMV 9	Sham ST 9	DM TMV 8	DM ST 8
Diafragma (μm)	284,2 \pm 170,02	304,09 \pm 88,7	196,1 \pm 30,1	163,5 \pm 53,4*
Tibial Anterior (μm)	330,3 \pm 94,9	378,5 \pm 39,6	228,4 \pm 55,5 ^{εα}	257,3 \pm 49,6*
Sóleo (μm)	357,5 \pm 62,7	424,9 \pm 87,02	285,7 \pm 53,2 ^ε	290,4 \pm 46,6*

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão; N: número de animais; TMV: treinamento muscular ventilatório; ST: sedentário; DM: diabetes mellitus.

* Diferença entre Sham ST vs. DM ST; $P < 0,005$;

^ε Diferença entre Sham ST vs. DM TMV; $P < 0,005$;

^α Diferença entre Sham TMV vs. DM TMV; $P < 0,005$.

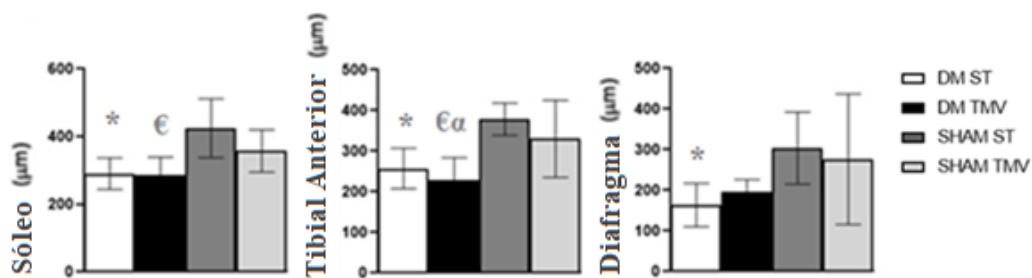


Figura 9. Comparação da área da secção transversa dos músculos Diafragma, Tibial Anterior e Sóleo entre os grupos (* Diferença entre Sham ST vs. DM ST; $P < 0,005$; € Diferença entre Sham ST vs. DM TMV; $P < 0,005$; α Diferença entre Sham TMV vs. DM TMV; $P < 0,005$).

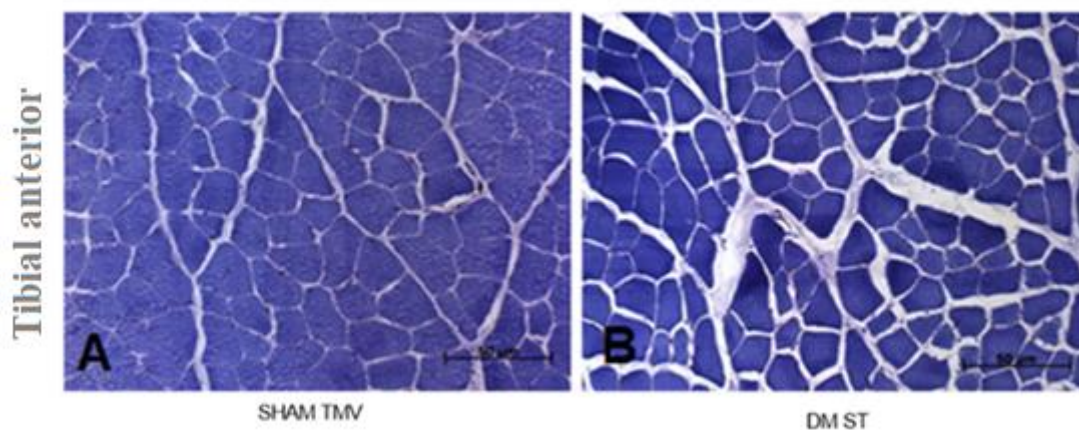


Figura 10. Fotomicrografias do músculo Tibial Anterior. (A= Sham TMV; B= DM ST).

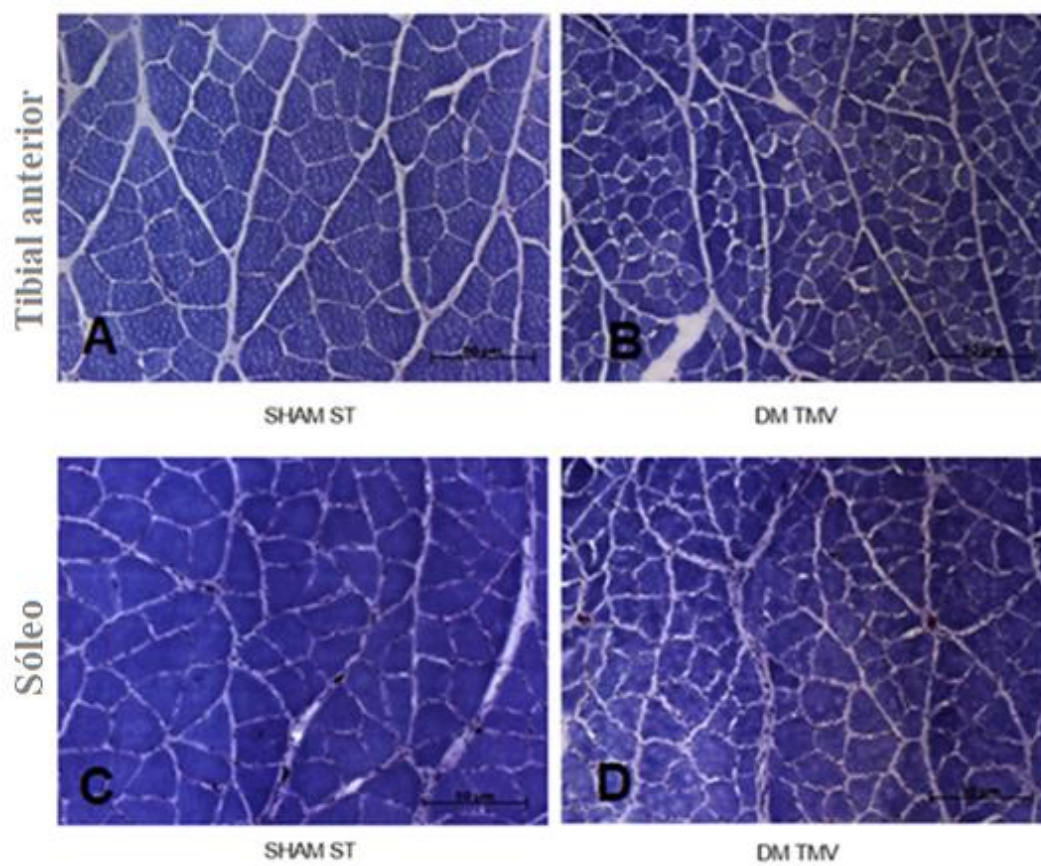


Figura 11. Comparação da área da secção transversa dos músculos Tibial Anterior e Sóleo entre os grupos (A e C= Sham ST; B e D= DM TMV).

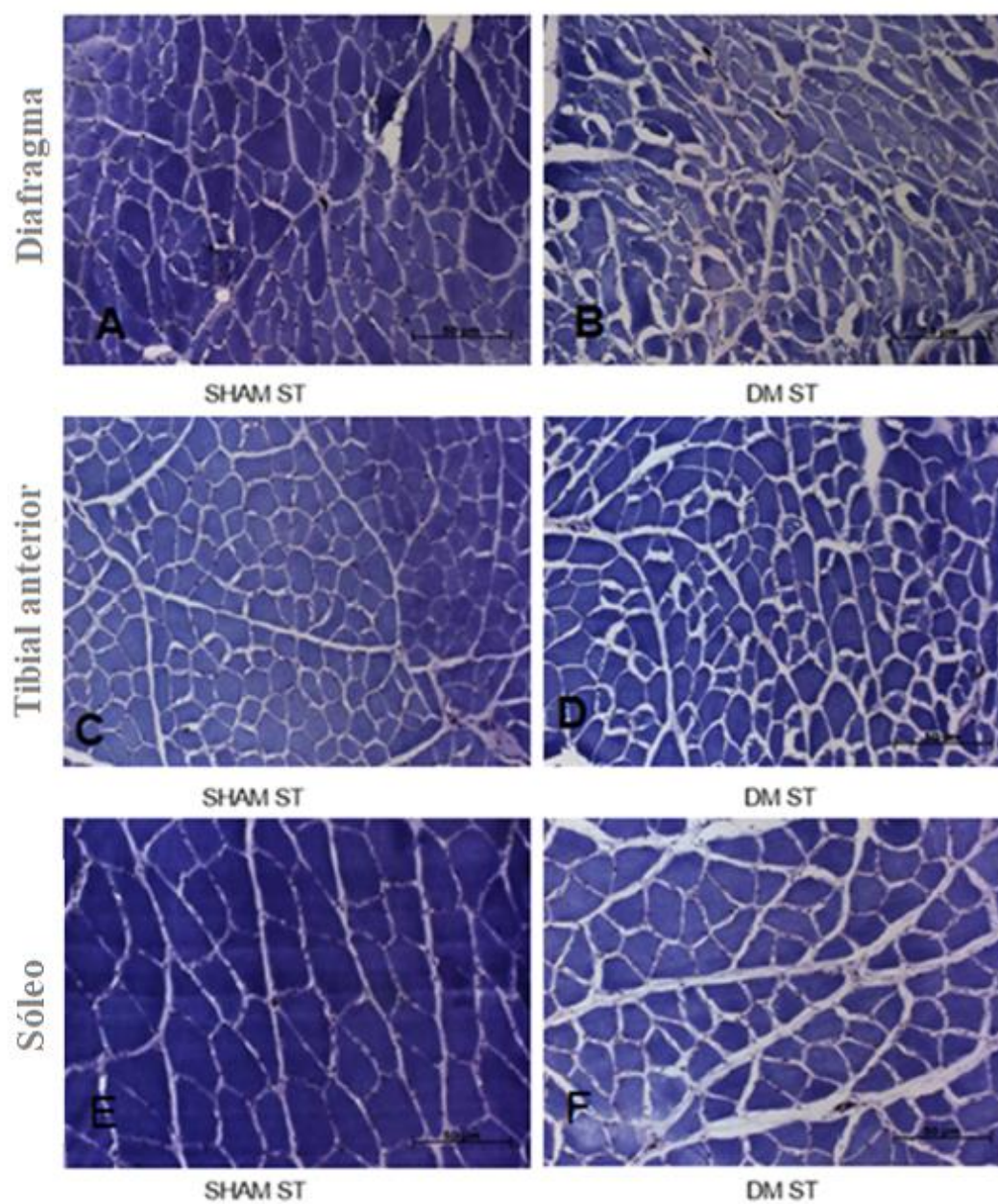


Figura 12. Comparação da área da seção transversa dos músculos Diafragma, Tibial Anterior e Sóleo. (A, C e E= Sham ST; B,D e F= DM ST).

5. DISCUSSÃO

5.1. Principais achados do estudo

Ainda é pouco conhecido sobre os potenciais efeitos do TMV em modelo de diabetes. Para uma melhor compreensão dos efeitos do TMV realizamos um estudo em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, focando nas alterações metabólicas, hemodinâmicas, da VFC e da área das fibras musculares, para melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos nessa patologia e como o TMV poderia amenizá-los.

Nossos principais achados foram que o modelo proposto acarretou em prejuízos na hemodinâmica cardíaca, por meio de diminuição da pressão arterial sistólica, diastólica e média, além do aumento da FC, e piora do desempenho ventricular. Contudo o TMV não foi capaz de inibir estes prejuízos.

O TMV potencializou a modulação parassimpática, avaliada pelo índice RMSSD, e reverteu o dano nos ratos DM.

5.2. Efeitos da estreptozotocina para induzir a DM em ratos

Os resultados do estudo demonstraram que a diabetes por STZ induziu distúrbios metabólicos, arteriais, ventriculares, autonômicos e musculares, quando comparado ao grupo Sham. Os animais diabéticos induzidos por STZ apresentaram sintomas semelhantes àqueles apresentados em humanos, como a perda de peso, aumento da ingestão alimentar, a poliúria e a hiperglicemia (JUNOD e cols. 1969).

A DM acarretou em prejuízos no controle na pressão artéria, sendo que observamos uma pressão arterial sistólica diminuída quando comparado ao sham com e

sem treinamento, bem como uma menor pressão arterial diastólica, pressão arterial média e aumento da FC comparados aos sham TMV.

Diversos estudos vêm demonstrando essa diminuição da pressão arterial basal em ratos diabéticos (MAEDA e cols., 1995a; DALL`AGO e cols., 1997; SCHAAAN e cols., 1997; DE ANGELIS e cols., 2000), o que vem sendo associado à redução do desempenho ventricular (DE ANGELIS e cols., 2000). No presente estudo, o grupo DM sedentário demonstrou uma menor contratilidade do VE quando comparados aos sham TMV, bem como uma diminuição da complacência do VE tanto no Sham treinado ou sem treinamento. Estes achados foram previamente demonstrados por outros autores como efeitos da DM por indução de STZ (DOBRZYNSKI e col., 2002; FEIN e cols., 1980; AKULA e cols., 2003; DE ANGELIS e cols., 2000).

A disfunção simpática produzida pela DM é explicada pela deservação distal e hiperinervação proximal do ventrículo esquerdo, alterando a sua estabilidade elétrica e fluxo sanguíneo do miocárdio, levando a potenciais riscos de arritmias (STEVENS e cols., 1998). Neste contexto, Otake e cols., 2009 relataram que uma má remodelação neural pode desempenhar um papel crucial no aumento da vulnerabilidade à fibrilação atrial como complicação da DM.

No estudo de Li e cols., 2015 que avaliaram a VFC em ratos diabéticos induzidos por STZ, foi demonstrado que a modulação simpática aumentou enquanto a modulação parassimpática diminuiu. Estes achados foram explicados pela intensa remodelação que ocorre com a progressão da doença nos nervos autonômicos produzidas pelo modelo. Eles observaram que nos primeiros 3 dias após a injeção da STZ, os sintomas simpáticos e parassimpáticos eram provenientes da lesão aguda, porém nas semanas 1 a 3, os parâmetros da VFC diminuíram, exceto o SDANN, possivelmente pelo efeito direto da STZ, ao invés da hiperglicemia. Ainda neste estudo

de Li e cols. (2015), os ratos diabéticos apresentaram uma rápida diminuição de RMSSD e um aumento reflexo do SDANN durante as primeiras 3 semanas após a administração da STZ. Depois disso, o RMSSD continuou em uma tendência descendente, enquanto o SDANN flutuou em alto nível. Nas semanas 4 e 5, a SDNN diminuiu. Nas semanas 6 a 10, o tônus parassimpático permaneceu em níveis baixos, enquanto o tônus simpático (SDANN) aumentou levemente, já os índices de LF/HF foram elevados, mostrando que o tônus simpático era dominante. Nos ratos DM, o tônus vagal diminuiu gradualmente após injeção de STZ, enquanto apresentou hiperatividade nos nervos simpáticos, sugerindo que a hiperglicemia produziu lesão mais grave aos receptores colinérgicos do que aos nervos simpáticos, e a capacidade de autorreparo dos nervos colinérgicos foram mais fracas, ou que nervos simpáticos tinham maior capacidade de remodelação.

Outros estudos também demonstraram essa diminuição do tônus parassimpático e predominância de alterações simpáticas nos ratos com DM por STZ (SCHAAN, 2004; YANG & CHON, 2011).

5.3. Efeitos do TMV

No presente estudo, um dos efeitos benéficos demonstrados pelo TMV foi: 1) menor FC do grupo DM TMV quando comparados aos animais não treinados; e 2) aumento do índice RMSSD no grupo DM TMV quando comparado aos grupos sham ou DM sedentário.

Estes achados podem ser explicados pelos potenciais efeitos do TMV observados em indivíduos saudáveis por promover um aumento do tônus vagal e assim também melhora a capacidade ao exercício (HEPBURN, 2005).

Estudos mostram que a melhora do SNA é promovida através da estimulação baroreflexa, por meio de mudanças no padrão respiratório e ativação do metaborreflexo promovida pelo TMV. A interação dos reflexos: quimiorreflexo central e periférico (estimulado por mudanças de CO₂ e O₂), metaborreflexo (ativado pelo acúmulo de metabólitos) e barorreflexo (sensíveis à pressão) são ajustados através de respostas ventilatórias e circulatórias. O aumento da ventilação estimula receptores de estiramento pulmonar, impedindo o aumento no volume inspiratório, enquanto o aumento da pressão arterial estimula os barorreceptores que reduzem a atividade nervosa simpática e elevam a atividade vagal, que leva a redução da pressão arterial e FC (FERREIRA e cols., 2013; WITT e cols., 2007; JONES e cols., 2015; SCHMIDT e cols., 2005).

5.4. Efeitos do TMV em ratos diabéticos

No presente estudo, os ratos diabéticos que realizaram o TMV apresentaram maior peso da musculatura cardíaca do que o grupo DM sem treinamento. Entre tanto, os ratos DM apresentaram diminuição de massa muscular, que foi observado pela menor área de fibras musculares no diafragma, sóleo e tibial anterior, quando comparados ao grupo Sham sem treinamento.

Em humanos o TMI pode auxiliar na força e na resistência muscular de diabéticos, porém, há uma busca pelo melhor protocolo, com o objetivo de constatar os benefícios desses desfechos metabólicos, como o controle glicêmico e assim uma melhor síntese proteica (MUECKLER, 1994; AUGUSTIN, 2010). Um protocolo de 12 semanas com carga de 40% da P_{Imax} em indivíduos com resistência à insulina reduziu glicose e a insulinemia (SILVA e cols., 2012). Já o mesmo protocolo em 8 semanas em idosos com hiperglicemia somente reduziu a glicose (DOS SANTOS e col., 2015). O treinamento em mulheres com DM, que foi aumentado gradativamente durante as 8

semanas, atingindo 30 minutos somente nas 3 últimas semanas, não apresentou diferença nas concentrações de glicose (AHMAD , 2017). Indivíduos com Síndrome Metabólica, treinados durante 7 dias (15 minutos, 3 vezes ao dia) com carga de 30% da P_Imax não apresentou diminuição na glicose (FERIANI e cols., 2017). E indivíduos com DM tipo 2, com uma única carga de alta resistência do TMV (60% P_Imax) demonstrou uma redução de 40% nos níveis de glicose (CORRÊA e cols., 2015).

Diante de todas as alterações apresentadas pela indução do DM por STZ , o presente estudo não apresentou diminuição na glicemia com o TMV, porém, na VFC foi demonstrado que o TMV foi capaz de estimular o controle autonômico parassimpático, observado pelo maior índice RMSSD, quando comparamos os grupos DM sem treinamento com os DM treinados. Contudo, este é o primeiro estudo a observar tais efeitos positivos em modelo de DM com SZT.

Um estudo prévio, conduzido por Jaenisch e cols., 2016, com o mesmo protocolo de TMV em um modelo de indução de insuficiência cardíaca, demonstrou os mesmos achados aqui apresentados, ou seja, uma modulação benéfica de índice de VFC representativo parassimpático.

O TMI de oito semanas com carga de 30% da pressão inspiratória máxima (P_Imax) mostra aumentar a resistência e a força muscular inspiratória, em indivíduos com DM tipo 2 e com neuropatia autonômica e fraqueza muscular inspiratória (CORRÊA e cols., 2011), ainda, em outras populações em indivíduos com fibrilação atrial e síndrome metabólica, o TMI foi capaz também de melhorar a função pulmonar (FERIANI e cols., 2017). Nos indivíduos diabéticos, o TMI foi eficaz na melhora da força respiratória e do controle autonômico (KAMINSKI e cols., 2015).

Bisschop (1997), com protocolo de 8 semanas de carga baixa a moderada inspiratória, constatou aumento nas dimensões das fibras diafragmáticas em ratos, o que não observamos no nosso protocolo de 6 semanas.

Este estudo traz importantes achados dos efeitos potenciais do TMV em modelo de diabetes. Ressalta-se ainda, que, no presente estudo, não se fez uso de nenhum tratamento medicamentoso nesses animais, objetivando controlar a hiperglicemia, diferentemente dos modelos em humanos. Porém, estudos prévios têm demonstrado que os índices de variabilidade da frequência cardíaca podem ser normalizados em diferentes graus, com o uso de insulina e meticobal, mas os índices não retornaram ao nível normal após o tratamento, (LI X e cols., 2015).

Limitações do Estudo

O modelo diabético por STZ apesar de ser muito utilizado em vários outros trabalhos com diabetes experimental promove um estado diabético com índices glicêmicos de difícil controle em cada animal, o que leva a perda amostral devido às debilidades desenvolvidas em alguns animais. Outro ponto muito discutido é a toxicidade da estreptozotocina e outros órgãos e até mesmo em tecido muscular, porém seu uso ainda é bem aceito na literatura.

Apesar da padronização dos orifícios, não foi possível monitorar a carga imposta durante a respiração dos animais, esse controle da pressão permitiria padronização da carga imposta ao treinamento.

Finalmente uma importante limitação do estudo que devemos apontar, foi que apesar da VFC ser mensurada pelo ECG de forma comumente com os animais sedados com cetamina e xilazina, isso pode atenuar os índices autonômicos cardíacos (Albrecht e cols., 2014).

6. CONCLUSÃO

O TMV foi capaz de promover atenuação da FC nos animais saudáveis. O TMV também acarretou em melhora da modulação parassimpática.

A Indução de DM por STZ acarretou em perda de peso do músculo cardíaco, alterações das variáveis hemodinâmicas como redução da PS, PD e PM, aumento na FC e um maior período de contração e relaxamento do VE. A VFC mostrou-se diminuição do índice RMSSD, e quanto à massa muscular, observamos uma menor área de fibras musculares dos músculos diafragma, do sóleo e do tibial anterior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD A. M. Effect of Inspiratory Muscle Training on Blood Glucose Levels and Serum lipids in female patients with type 2 diabetes. ABDELSALAM. H. M. International Journal of ChemTech Research Vol.10 No.4. pp 703-709 2017.
- AKULA A.; KOTA M. K.; GOPISETTY S. G., CHITRAPU R. V.; KALAGARA M.; KALAGARA S.; VEERAVALLI K. K.; GOMEDHIKAM J.P. Biochemical, histological and chocardiographic changes during experimental cardiomyopathy in STZ-induced diabetic rats. Pharmacol Res. 2003; 48(5): 429-35.
- ALBRECHT M.; HENKE J.; TACKE S.; MARKERT. M.; GUTH B. Effects of isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl on physiological variables continuously measured by telemetry in Wistar rats. BMC Vet Res. 2014;10:198. Published 2014 Aug 23. doi:10.1186/s12917-014-0198-3
- ANDERSEN. H. e cols. Isokinetic muscle strength in long-term IDDM patients in relation to diabetic complications. Diabetes. v. 45. n. 4. p. 440–5. abr. 1996.
- ANDERSEN H. e cols. Muscular atrophy in diabetic neuropathy: a stereological magnetic resonance imaging study. Diabetologia. v. 40. n. 9. p. 1062–9. set. 1997.
- ANDERSEN H.; GJERSTAD M. D.; JAKOBSEN. J. Atrophy of foot muscles: a measure of diabetic neuropathy. Diabetes care. v. 27. n. 10. p. 2382–5. out. 2004.
- ANDERSEN H.; SCHMITZ O.; NIELSEN S. Decreased isometric muscle strength after acute hyperglycaemia in Type 1 diabetic patients. Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association. v. 22. n. 10. p. 1401–7. out. 2005.
- BASSI D.; SANTOS-DE-ARAÚJO A. D.; CAMARGO P. F.; DIBAI-FILHO A. V., DA FONSECA M. A. MENDES R. G.; BORGHI-SILVA A. Inter and Intra-Rater Reliability of Short-Term Measurement of Heart Rate Variability on Rest in Diabetic Type 2 Patients.J Med Syst. 2018 Oct 16;42(12):236.
- BISSCHOP A.; GAYAN-RAMIREZ G.; ROLLIER H.; GOSSELINK R.; DOM R.; DE BOCK V.; DECRAMER M. Intermittent inspiratory muscle training induces fiber hypertrophy in rat diaphragm. Am J Respir Crit Care Med 155:1583–1589. 1997.
- BORTOLOTTO L. A. Alterações das propriedades funcionais e estruturais de grandes artérias no diabetes mellitus. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. v. 51. n. 2. p. 176–184. mar. 2007.
- CARVALHEIRA J. B. C.; ZECCHIN H. G.; SAAD. M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. v. 46. n. 4. p. 419–425. ago. 2002.

- CORRÊA A. P. e cols. Effect of acute inspiratory muscle exercise on blood flow of resting and exercising limbs and glucose levels in type 2 diabetes. *Plos One*. v. 10. n. 3. p. e0121384. 2015. ISSN 1932-6203.
- CORRÊA A. P. e cols. Inspiratory muscle training in type 2 diabetes with inspiratory muscle weakness. *Med Sci Sports Exerc*. v. 43. n. 7. p. 1135-41. Jul 2011. ISSN 1530-0315.
- DALL'AGO P. e cols . Reflex control of arterial pressure and heart rate in shortterm streptozotocin diabetic rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 35. n. 7. p. 843–849. jul. 2002.
- DALL'AGO P.; FERNANDES T. G.; MACHADO U. F.; BELLÓ A. A.; IRIGOYEN M. C. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res*. 1997; 30(1):119-24.
- DALL'AGO P.; SILVA V. O.; DE ANGELIS K.L.; IRIGOYEN M.C.; FAZAN R. JR.; SALGADO H. C. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. *Braz J Med Biol Res*. 2002; 35(7):843-9.
- DE ANGELIS K. L.; OLIVEIRA A. R.; DALL'AGO P.; PEIXOTO L. R.; GADONSKI G.; LACCHINI S.; FERNANDES T. G.; IRIGOYEN M. C. Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res*. 2000 Jun; 33(6): 635- 41.
- DE DEUS A. P.; DE OLIVEIRA C. R.; SIMÕES R. P.; BALDISSERA V.; DA SILVA C. A.; ROSSI B. R.; DE SOUSA H. C.; PARIZOTTO N. A.; ARENA R.; BORGHI-SILVA A. Metabolic and cardiac autonomic effects of high-intensity resistance training protocol in Wistar rats. *J Strength Cond Res*. 2012 Mar;26(3):618-24.
- DOS SANTOS SILVA M. e cols. Influence of Inspiratory Muscle Training on Changes in Fasting Hyperglycemia in the Older Adult: The Epidoso Project. *J Diabetes Sci Technol*. v. 9. n. 6. p. 1352-3. Aug 2015. ISSN 1932-2968.
- DOBRYNSKI 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.
- DUTRA D. B. e cols. Expression of myostatin, myostatin receptors and follistatin in diabetic rats submitted to exercise. *Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology*. São Carlos. v. 39. p.417-422. fev. 2012.
- ELEAZU e cols. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 2013. 12:60.
- EWING D. J.; CAMPBELL I. W.; CLARKE B. F. The natural history of diabetic autonomic neuropathy. *Q J Med*. 1980; 49: 95-108.

- FAZAN R. JR.; BALLEJO G.; SALGADO M. C.; MORAES M. F.; SALGADO H. C. Heart rate variability and baroreceptor function in chronic diabetic rats. *Hypertension*. 1997; 30 (3 Pt 2): 632- 5.
- FEIN F. S.; KORNSTEIN L. B.; STROBECK J. E.; CAPASSO J. M.; SONNENBLICK E. H. Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circulation research*. 1980; 47: 922-933.
- FERIANI D. J. e cols. Effects of inspiratory muscle exercise in the pulmonary function, autonomic modulation, and hemodynamic variables in older women with metabolic syndrome. *J Exerc Rehabil*. v. 13. n. 2. p. 218-226. Apr 2017.
- FERREIRA J. B.; PLENTZ R. D.; STEIN C.; CASALI K. R.; ARENA R.; LAGO P. D. Inspiratory muscle training reduces blood pressure and sympathetic activity in hypertensive patients: a randomized controlled trial. *Int J. Cardiol*. 2013; 166 (1) : 617. doi: 10.1016/j.ijcard.2011.09.069.
- FINUCANE M. M. e cols. National, regional and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *The Lancet*. [s.l.]. v. 377. n. 9765. p.557-567. fev.2011. DOI: 10.1016/s0140-6736(10)62037-5.
- FROM A. M.; SCOTT C. G.; CHEN H. H. The development of heart failure in patients with diabetes mellitus and pre-clinical diastolic dysfunction a population-based study. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 300–305.
- FRUSTACI A.; KAJSTURA J.; CHIMENTI C.; JAKONIUK I.; LERI A.; MASERI A.; NADAL-GINARD B.; ANVERSA P. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res*. 2000;87:1123–1132.
- GIGO-BENATO D.; RUSSO T. L.; GEUNA S.; DOMINGUES N. R. S. R.; SALVINI T. F. & PARIZOTTO N. A. (2010). Electrical stimulation impairs early functional recovery and accentuates skeletal muscle atrophy after sciatic nerve crush injury in rats. *Muscle & Nerve*. 41(5). 685–693. doi:10.1002/mus.21549 .
- HEAD G. A.; MCCARTY R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. *J. Auton. Nerv. Syst*. 21. 203–213. 1987.
- HEPBURN H.; FLETCHER J.; ROSENGARTEN T. H.; COOTE J. H. Cardiac vagal tone, exercise performance and the effect of respiratory training. *Eur J Appl Physiol* 94: 681–689. 2005.
- HICKS K. K. e cols. Effects of streptozotocin-induced diabetes on heart rate, blood pressure, and cardiac autonomic nervous control. *J. Auton. Nerv. Syst*. 1998; 69: 21–30.

- JAENISCH R. B.; HENTSCHKE V. S.; QUAGLIOTTO E.; CAVINATO P. R.; SCHMEING L. A.; XAVIER L. L. e cols. Respiratory muscle training improves hemodynamics. autonomic function. baroreceptor sensitivity. and respiratory mechanics in rats with heart failure. *Journal of applied physiology*. 2011 Dec;111(6):1664-70. PubMed PMID: 21903877.
- JAENISCH R. B.; QUAGLIOTTO E.; CHECHI C.; CALEGARI L.; SANTOS F.; BORGHI-SILVA A. AND DAL LAGO P. Respiratory muscle training improves chemoreflex response. heart rate variability. and respiratory mechanics in rats with heart failure. *Canadian Journal of Cardiology* . nov. 2016.
- JEONG J.; CONBOY M. J.; CONBOY I. M. Pharmacological inhibition of myostatin/TGF- β receptor/pSmad3 signaling rescues muscle regenerative responses in mouse model of type 1 diabetes. *Acta pharmacologica Sinica*. v. 34. n. 8. p. 1052–60. ago. 2013.
- JONES C. U.; SANGTHONG B.; PACHIRAT O.; JONES D.A. Slow breathing training reduces resting blood pressure and the pressure responses to exercise. *Physiol Res*. 2015;64(5):673-82.
- JUNOD A.; LAMBERT A. E.; STAUFFACHER W.; RENOLD A. E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest*. 1969 Nov; 48(11): 2129-39.
- KAMINSKI D.M. e cols. Inspiratory muscle training in patients with diabetic autonomic neuropathy: A randomized clinical trial. *Clinical Autonomic Research*. Porto Alegre. v. 25. p.263-266. 16 maio 2015.
- KAMINSKI D. M. e cols. Inspiratory muscle weakness is associated with autonomic cardiovascular dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Auton Res*. v. 21. n. 1. p. 29-35. Feb 2011. ISSN 1619-1560.
- KIMBALL S. R.; VARY T. C.; JEFFERSON L. S. Regulation of protein synthesis by insulin. *Annual review of physiology*. v. 56. p. 321–48. jan. 1994.
- KO H.J.; ZHANG Z.; JUNG D.Y.; JUN J.Y.; MA Z.; JONES K.E.; CHAN S.Y.; KIM J.K. Nutrient stress activates inflammation and reduces glucose metabolism by suppressing AMP-activated protein kinase in the heart. *Diabetes*.2009;58:2536–2546. doi: 10.2337/db08-1361.
- KRAUSE M. P.; RIDDELL M. C.; HAWKE T. J. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: Clinical observations and physiological mechanisms. *Pediatric Diabetes*. v. 12. n. ii. p. 345–364. 2010.
- Li X e cols. Analysis of Heart Rate Variability and Cardiac Autonomic Nerve Remodeling in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2015; 123: 272–281.
- MAEDA C.Y.; FERNANDES T.G. LULHER F. IRIGOYEN M.C. Streptozotocin

- diabetes modifies arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. *Braz J Med Biol Res.* 1995a; 28(4) Apr: 497-501.
- MALLIANI A. e cols. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 84. 482–492. 1991.
- MARQUARDT P.W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 26. 431–441. 1963.
- MATTEI J. e cols. Reducing the global burden of type 2 diabetes by improving the quality of staple foods: The Global Nutrition and Epidemiologic Transition Initiative. *Globalization and Health*. [s.l.]. v. 11. n. 1. p.11-23. 4 jun. 2015. DOI:10.1186/s12992-015-0109-9.
- MUECKLER M. Facilitative glucose transporters. *European journal of biochemistry / FEBS.* v. 219. n. 3. p. 713–25. fev. 1994.
- OLIVEIRA J.E.P. Conceito. Classificação e Diagnóstico do Diabetes Mellitus. In: OLIVEIRA. J.E.P.; MILECH. A. *Diabetes Mellitus: Clínica. Diagnóstico Tratamento Multidisciplinar.* São Paulo: Atheneu. 2006. Cap. 2. p. 7-18.
- OTAKE H. e Cols. Influences of autonomic nervous system on atrial arrhythmogenic substrates and the incidence of atrial fibrillation in diabetic heart. *Int Heart J* 2009; 50: 627–641.
- PAOLILLO F.R.; ARENA R.; DUTRA D. B.; DE CASSIA MARQUETI DURIGAN R.; DE ARAUJO H. S.; DE SOUZA H. C.; PARIZOTTO N. A.; CIPRIANO G. JR.; CHIAPPA G.; BORGHI-SILVA A. Low-level laser therapy associated with high intensity resistance training on cardiac autonomic control of heart rate and skeletal muscle remodeling in wistar rats. *Lasers Surg Med.* 2014 Dec;46(10):796-803. doi: 10.1002/lsm.22298. Epub 2014 Nov 1.
- PICKUP J.C. & WILLIAMS G. *Chronic Complications of Diabetes.* Blackwell Science. London 1994.
- PIKKUJÄMSÄ S.M.; HUIKURI I.I.V.; AIRAKSINEN K.E. e cols. Heart rate variability and baroreflex sensitivity in hypertensive subjects with and without metabolic features of insulin resistance syndrome. *Am J Hypertens.* 1998; 11:523-31.
- QUAGLIOTTO E.; NECKEL H.; RIVEIRO D.F.; CASALI. K.R.; MOSTARDA C.; IRIGOYEN M.C.; DALL'AGO P.; RASIA-FILHO A.A. Histamine in the posterodorsal medial amygdala modulates cardiovascular reflex responses in awake rats. *Neuroscience* 157. 709–719. 2008.
- RICHARD M.J & RICHARD W.N. Acute myocardial infarction in the diabetic patient: pathophysiology, clinical course and prognosis. *J Am Coll Cardiol.* 1992; 20: 736-44.

- ROGATTO G. P. & LUCIANO E. Influência do Treinamento Físico Intenso Sobre o Metabolismo de Proteínas. *Motriz*. v.9. n.2. p. 75-82 Jul-Dez 2001. SMITH L. L. Musculoskeletal manifestations of diabetes mellitus. *British Journal of Sports Medicine*. v. 37. n. 1. p. 30–35. 1 fev. 2003.
- RODRIGUES B. Curso temporal das avaliações morfofuncionais e hemodinâmicas em ratos diabéticos e infartados [tese]. São Paulo: . Faculdade de Medicina; 2008 [citado 2020-02-13]. doi:10.11606/T.5.2008.tde-24042008-131611.
- RODRIGUES FILHO O. A. & FAZAN V. P. Streptozotocin induced diabetes as a model of phrenic nerve neuropathy in rats. *J Neurosci Methods*. v. 151. n. 2. p.131-8. Mar 2006. ISSN 0165-0270.
- ROSSINI A.A. Autoimmune diabetes and the circle of tolerance. *Diabetes*. V.53. n. 2. p. 267-275. 2004. RUBINI R.; PORTA A.; BASELLI G.; CERUTTI S.; PARO M. Power spectrum analysis of cardiovascular variability monitored by telemetry in conscious unrestrained rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 45. 181–190. 1993.
- SAMPAIO L.M.M. e cols. Força muscular respiratória em pacientes asmáticos submetidos ao treinamento muscular respiratório e treinamento físico. *Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo*. São Paulo. v. 9. n. 2. p.43-48. jun.2002.
- SCHAAN B.D.; DALL’AGO P.; MAEDA C.Y. e cols. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 1895–1902.
- SCHAAN B.D.; MAEDA C.Y.; TIMM H.B.; MEDEIROS S.; MORAES R.S.; FERLIN E.; FERNANDES T.G.; RIBEIRO J.P.; SCHMID H.; IRIGOYEN M.C. Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in streptozotocin-induced diabetic rats treated with insulin. *Braz J Med Biol Res*.1997 Sep; 30(9): 1081-6.
- SCHMIDT H.; FRANCIS D.P.; RAUCHHAUS M.; WERDAN K.; PIEPOLI M.F. Chemo- and ergoreflexes in health. disease and ageing. *Int J Cardiol*. 2005;98(3):369-78.
- SHIMADA K.; CROTHER T.R.; KARLIN J. e cols. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity*. 2012;36:401–414. doi: 10.1016/j.immuni.2012.01.009.
- SILVA M. O. S. e cols. Inspiratory training increases insulin sensitivity in elderly patients. *Geriatr Gerontol Int*. v. 12. n. 2. p. 345-51. Apr 2012. ISSN 1447-0594.
- SILVA M.S.; MOSTARDA C.; LOPES G.S. Inspiratory Muscle Training Reduces Sympathetic Modulation in Elderly Patients with Insulin Resistance. *Journal Of Diabetes Science And Technology*. São Paulo. p. 1654-1656. 2013. SMITH S. Reduced sinus arrhythmia in diabetic neuropathy: diagnostic

value of an age related normal range. *BMJ* 1982; 285: 1599-601.

SOUZA H.C.; MARTINS-PINGE M.C.; DIAS DA SILVA V.J.; BORGHISILVA A.; GASTALDI A.C.; BLANCO J.H. and TEZINI. G.C. Heart rate and arterial pressure variability in the experimental renovascular hypertension model in rats. *Auton Neurosci* 139: 38–45. 2008.

STEVENS M.J.; RAFFEL D.M.; ALLMAN K.C.; DAYANIKLI F.; FICARO E.; SANDFORD T.; WIELAND D.M.; PFEIFER M.A.; SCHWAIGER M. Cardiac Sympathetic dysinnervation in diabetes: implications for enhanced cardiovascular risk. *Circulation*. 1998; 98: 961-968.

Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement. physiological interpretation and clinical use. *Circulation* 93. 1043–1065. 1996.

WILD. S. e cols. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. [s.l.]. v. 27. n. 5. p.1047-1053. 26 abr.2004.DOI:10.2337/diacare.27.5.1047.

WITT J.D.; GUENETTE J.A.; RUPERT J.L.; MCKENZIE D.C.; SHEEL A.W. Inspiratory muscle training attenuates the human respiratory muscle metaboreflex. *J Physiol*. 2007; 583(3):1019-28. doi: 10.1113/jphysiol.2007.140855.

World Health Organization. Global health estimates: deaths by cause, age, sex and country. 2000-2012.[s.l.]. [s.v.]. [s.n.]. maio 2014.

YANG B. & CHON K.H. Assessment of diabetic cardiac autonomic neuropathy in type I diabetic mice. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2011; 2011: 6560–6563.

YESIL Y. e cols. Phrenic neuropathy in diabetic and prediabetic patients without neuromuscular complaint. *Acta Diabetol*. v. 50. n. 5. p. 673-7. Oct 2013. ISSN 1432-5233.

ZHANG W.; LAVINE K.J.; EPELMAN S.; EVANS S.A.; WEINHEIMER C.J.; BARGER P.M.; MANN D.L. Necrotic myocardial cells release damage-associated molecular patterns that provoke fibroblast activation in vitro and trigger myocardial inflammation and fibrosis in vivo. *J Am Heart Assoc*. 2015;4:e001993. doi: 10.1161/JAHA.115.001993.

ZIEGLER D. Cardiovascular autonomic neuropathy: clinical manifestations and measurement. *Diabetes Reviews*. 1999; 7:300-15.