

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (UNIRIO)

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)

INSTITUTO BIOMÉDICO (IB)

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ALICE PEREIRA DUQUE

**EFEITOS DA *BACCHARIS TRIMERA* SOBRE A NEUROPATIA AUTONÔMICA
CARDIOVASCULAR DIABÉTICA**

RIO DE JANEIRO

2017

ALICE PEREIRA DUQUE

**EFEITOS DA *BACCHARIS TRIMERA* SOBRE A NEUROPATIA AUTONÔMICA
CARDIOVASCULAR DIABÉTICA**

Monografia apresentada ao curso de graduação em Biomedicina da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de bacharel.

Professor orientador: Luiz Fernando Rodrigues Junior

RIO DE JANEIRO

2017

ALICE PEREIRA DUQUE

**EFEITOS DA *BACCHARIS TRIMERA* SOBRE A NEUROPATIA AUTONÔMICA
CARDIOVASCULAR DIABÉTICA**

Monografia apresentada ao curso de graduação em Biomedicina da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de bacharel.

Aprovado em de de 2017

BANCA EXAMINADORA

Cristiane Barbosa Rocha, PhD
Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF - UNIRIO)

Ricardo Felipe Alves Moreira, PhD
Departamento de Saúde Coletiva (DSC - UNIRIO)

Luiz Fernando Rodrigues Junior, PhD - Orientador
Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF - UNIRIO)

*A todas as vidas que não puderam
esperar o tempo da ciência.*

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, a Deus e todos os nossos protetores, por me permitirem e ajudarem a chegar até aqui. Sou e serei eternamente grata por tudo o que fazem por nós.

A minha mãe, meu irmão, meu pai e minha avó. Agradeço por terem me ensinado a acreditar em Deus e por serem sinônimo do que eu desejo para minha vida profissional. Mesmo que nossas vidas continuem sendo repletas de luta, esforço e perseverança, vocês sempre serão a minha base, o meu esteio, o meu maior tesouro.

À Vera e Paulo, extensão da nossa família, por tudo o que sempre fizeram por nós. Obrigada por cada palavra amiga, oração, apoio, e por sempre nos socorrerem nas dificuldades.

Aos meus queridos amigos da UNIRIO, os que entraram na turma de 2013.1 e os que foram a ela agregados, nos tornamos realmente uma equipe por causa de parasito. À Carole Massolar, Jessica Honorato, Michelle Gomes, Isabela Gomes, Mayra Braga, Luiza Paternostro, Lucas Quintaes, Nicole Melo, Thaynan Lopes, Alexandre Paiva e Maiara Guedes (agregada com amor à UNIRIO), sintam-se igualmente agradecidos. Saibam que a forma com que me acolheram, principalmente nos primeiros períodos, fez com que eu me sentisse em casa. Enfrentamos bravamente todos esses anos da faculdade e saímos vitoriosos, tenho muito orgulho de todos vocês. Tenho certeza que serão profissionais brilhantes.

Especialmente, agradeço a Jessica Honorato e Michelle Gomes, mais do que amigas e parceiras de saídas, vocês se tornaram as pessoas com quem eu passei a compartilhar todos os meus sentimentos. Com vocês, sinto a segurança de uma amizade verdadeira. Nossos laços se estreitaram ainda mais no final da faculdade e vocês se tornaram irmãs pra mim.

Particularmente, à Carole Massolar, por ter me acompanhado desde zoologia até o último momento em microbiologia. Unimo-nos tanto, que além de troca instantânea de pensamento e de doenças (risos), fizemos tudo juntas, curso, experimento, estágio e até trancamento de disciplina. Que esse apoio, que se estendeu até aqui na monografia, continue o mesmo em nossa segunda graduação,

e que a UNIRIO nos aceite novamente, mas dessa vez, para a realização de um sonho.

Ao Eugenio Fabio da Silva, por sempre nos entender quando chegamos atrasadas pedindo o roteiro da aula, pelos materiais que você mesmo recomendava que tirássemos cópia, por nos ouvir sempre que precisamos desabafar sobre quão pesado está o período, e por literalmente salvar nossas vidas com as xerox (desde a época do Dante). Acima de tudo, por sua amizade e por desejar que retornemos em breve para UNIRIO. Você é melhor padrinho que qualquer aluno poderia ter.

Ao Lucas Nunes, grande amigo que, além do francês, me ensinou a ter mais paciência, esperança e a olhar a vida de outra forma.

As minhas amigas de Rio das Ostras, Carol Corrêa, Daiana Faltz e Letícia Campelo, principalmente por entenderem meu sumiço involuntário nos últimos tempos. Mesmo com a distância, nossa amizade continua e sempre continuará a mesma.

Aos professores e pesquisadores, Ricardo Felipe Alves Moreira, Cristiane Barbosa Rocha, Claudia Netto, Giselle Lopes, Ana Paula Rocha e todos os outros membros do grupo de pesquisa. Sobretudo ao Ricardo e à Cristiane, por terem me ensinado muito em suas respectivas disciplinas, diabetes *mellitus* e bioquímica 1, por me permitirem participar desse grupo de pesquisa, enriquecendo meu conhecimento teórico e prático, e principalmente, por terem aceitado o convite para participarem da minha banca. É um grande prazer tê-los como avaliadores.

Ao meu orientador, Luiz Fernando Rodrigues Júnior, por ter me aceitado como aluna de iniciação científica, me apresentado ao mundo da pesquisa, e por ter me dado a honra de participar deste trabalho e de tantos outros. Agradeço por todas as infinitas vezes que me ajudou, aconselhou e nos salvou em nossos experimentos. Obrigada por sempre nos ouvir e aceitar nossas sugestões, e pela paciência para sanar todas as nossas dúvidas. Os conhecimentos que adquiri no laboratório certamente ficarão para toda a vida. Espero, futuramente, poder lhe agradecer da mesma forma nas dissertações de mestrado e doutorado.

Finalmente, a todas as vidas (humanas e animais), que contribuíram para essa e todas as outras pesquisas. A evolução do conhecimento científico depende da pesquisa, e esta, depende de vocês. E que o objetivo maior desse esforço seja sempre ajudar o próximo.

A vida é como uma grande corrida de bicicleta – cuja meta é cumprir a Lenda Pessoal.

Na largada, estamos juntos – compartilhando camaradagem e entusiasmo. Mas, à medida que a corrida se desenvolve, a alegria inicial cede lugar aos verdadeiros desafios: o cansaço, a monotonia, as dúvidas quanto à própria capacidade. Reparamos que alguns amigos desistiram do desafio – ainda estão correndo, mas apenas porque não podem parar no meio de uma estrada. Eles são numerosos, pedalam ao lado do carro de apoio, conversam entre si, e cumprem uma obrigação.

Terminamos por nos distanciar deles; e então somos obrigados a enfrentar a solidão, as surpresas com as curvas desconhecidas, os problemas com a bicicleta.

Perguntamo-nos finalmente se vale a pena tanto esforço.

Sim, vale. É só não desistir.

Texto extraído do livro *Maktub*, de Paulo Coelho.

RESUMO

EFEITOS DA *BACCHARIS TRIMERA* SOBRE A NEUROPATIA AUTONÔMICA CARDIOVASCULAR DIABÉTICA

Introdução: O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCVs), maior causa de morte no mundo. A carqueja (*Baccharis trimera*), planta medicinal com ação antioxidante e hipoglicemiante, é uma alternativa promissora ao tratamento não farmacológico do DM2, porém, é necessário investigar seus efeitos sobre o sistema cardiovascular dos diabéticos. **Objetivo:** Investigar a segurança e a eficácia do óleo essencial de carqueja sobre a neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) em ratos diabéticos. **Metodologia:** Ratos *Wistar* machos foram divididos em quatro grupos experimentais: controle (ContVei; N=5), controle tratado com carqueja (ContCar; N=4), diabético (DMVei; N=4) e diabético tratado com carqueja (DMCar; N=5). A indução do DM2 foi feita através de dieta hipercalórica e estreptozotocina, e os grupos tratados receberam óleo essencial de carqueja enquanto os demais receberam veículo. A fim de se investigar as alterações promovidas pela neuropatia autonômica cardiovascular analisou-se parâmetros do eletrocardiograma e da variabilidade da frequência cardíaca. **Resultados:** Ratos diabéticos apresentaram distúrbios de repolarização ventricular e desbalanço simpátovagal, alterações compatíveis com a NAC. O tratamento com carqueja, no grupo diabético, reverteu apenas o desbalanço autonômico. Ao passo que, no grupo controle, o tratamento prolongou o período de repolarização ventricular. **Conclusão:** Os resultados sugerem que o tratamento com óleo essencial de carqueja piora a repolarização ventricular em ratos não diabéticos, porém reverte o desbalanço autonômico nos ratos diabéticos.

Palavras-chave: Carqueja, Neuropatia Autonômica Cardiovascular, Diabetes *Mellitus*.

ABSTRACT

EFFECTS OF *BACCHARIS TRIMERA* ON DIABETIC CARDIOVASCULAR AUTONOMIC NEUROPATHY

Introduction: The type 2 diabetes *mellitus* (T2DM) is one of the major risk factors for cardiovascular diseases (CVDs) development. CVDs are the leading cause of death worldwide. Carqueja (*Baccharis trimera*) is an antioxidant and hypoglycemic medicinal plant. Despite the promising action of this new agent on T2DM non-pharmacological treatment, is necessary to investigate its effects on cardiovascular system of diabetic patients. **Objective:** Investigate carqueja essential oil safety and efficacy on cardiovascular autonomic neuropathy (CAN) in diabetic rats. **Methodology:** Male *wistar* rats were randomized in four experimental groups: control (ContVei; N=5), carqueja-treated control (ContCar; N=4), diabetic (DMVei; N=4) and carqueja-treated diabetic (DMCar; N=5). T2DM was induced by hypercaloric diet followed by streptozotocin administration. Treated groups received carqueja essential oil and the others received a diluent. Electrocardiogram and heart rate variability parameters were used to analyze the CAN alterations. **Results:** Diabetic rats showed ventricular repolarization dysfunction and autonomic imbalance, similar as CAN alterations. Carqueja treatment in diabetic rats restored autonomic balance. Nevertheless, the treatment increased ventricular repolarization duration in control group. **Conclusion:** Results suggest that carqueja essential oil treatment worsen ventricular repolarization in non-diabetic rats and restores the autonomic balance in diabetic rats.

Keywords: Carqueja, Cardiovascular Autonomic Neuropathy, Diabetes *Mellitus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Anatomia do Sistema Nervoso Autônomo.....	20
Figura 2: Prevalência do Diabetes Mellitus.....	22
Figura 3: Dez principais causas de morte no mundo em 2015.....	23
Figura 4: Complicações Agudas e Crônicas desencadeadas pelo Diabetes Mellitus.....	27
Figura 5: Propagação dos estímulos elétricos pelas estruturas cardíacas e seus respectivos potenciais de ação.....	32
Figura 6: Oscilações dos intervalos entre batimentos cardíacos consecutivos em milissegundos.....	33
Figura 7: Mecanismo de ação das sulfoniluréias nas células β -pancreáticas e cardiomiócitos.....	37
Figura 8: Disposição dos polos para obtenção do registro eletrocardiográfico na derivação DII, <i>in vivo</i>	42
Figura 9: Representação do traçado do eletrocardiograma (acima) usado para obtenção dos intervalos RR que formam o tacograma (abaixo).....	43
Figura 10: Peso corpóreo.....	45
Figura 11: Razão indicativa de hipertrofia cardíaca: HW/BW.....	47
Figura 12: Razão indicativa de hipertrofia cardíaca: HW/TL.....	47
Figura 13: Traçados representativos do eletrocardiograma.....	48
Figura 14: Duração do intervalo QT e do intervalo QT corrigido (QTc).....	50

Figura 15: Duração do Intervalo <i>T_{peak-Tend}</i>.....	51
Figura 16: Frequência Cardíaca.....	51
Figura 17: Média e Mediana dos Intervalos RR	52
Figura 18: Parâmetros da VFC no domínio da frequência.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso do coração e comprimento da tíbia	46
Tabela 2: Parâmetros eletrocardiográficos	49
Tabela 3: Parâmetros da VFC no domínio do tempo e da frequência	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA: Associação Americana de Diabetes

AGEs: Produtos Finais de Glicação Avançada

AVE: Acidentes Vascular Encefálico

DA: Doença de Alzheimer

DAC: Doença Arterial Coronariana

DALA: Diabetes Autoimune Latente em Adultos

DCAF: Dieta de Cafeteria

DCVs: Doenças Cardiovasculares

DIMJ: Diabetes com Início na Maturidade do Jovem

DM: Diabetes *Mellitus*

DM1: Diabetes *Mellitus* tipo 1

DM2: Diabetes *Mellitus* tipo 2

DM3: Diabetes *Mellitus* tipo 3

DMG: Diabetes *Mellitus* Gestacional

DVP: Doença Vascular Periférica

E.P.M.: Erro Padrão da Média

ECG: Eletrocardiograma

FC: Frequência Cardíaca

HF: Componente de Alta Frequência

HVE: Hipertrofia Ventricular Esquerda

HW/BW: Razão do Peso do Coração pelo Peso Corporal

HW/TL: Razão do Peso do Coração pelo Comprimento Tibial

IAM: Infarto Agudo do Miocárdio

K_{ATP} : Canal de Potássio sensível à Adenosina Trifosfato

LF/HF: Índice Simpatovagal

LF: Componente de Baixa Frequência

MNN: Média dos Intervalos RR

MODY: Diabetes com Início na Maturidade do Jovem

NAC: Neuropatia Autonômica Cardiovascular

ND: Neuropatia Diabética

OMS: Organização Mundial da Saúde

pNN5: Percentual de intervalos RR que diferem mais do que 5 milissegundos de seu adjacente

QTc: Intervalo QT corrigido

rMSSD: Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre os intervalos RR normais consecutivos

SDNN: Desvio-padrão de todos os intervalos RR normais registrados em um intervalo de tempo

SNA: Sistema Nervoso Autônomo

SNP: Sistema Nervoso Parassimpático

SNS: Sistema Nervoso Simpático

STZ: Estreptozotocina

SUR: Receptor de Sulfoniluréia

VFC: Variabilidade da Frequência Cardíaca

VLF: Componente de Muita Baixa Frequência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Doenças Cardiovasculares	17
1.2 Sistema Nervoso Autônomo e as Doenças Cardiovasculares.....	19
1.3 Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2	22
1.4 Complicações do Diabetes Mellitus	26
1.5 Neuropatia Diabética.....	28
1.5.1 Neuropatia Autonômica Cardiovascular	28
1.5.2 Avaliação das alterações da NAC	30
1.5.2.1 Eletrocardiograma.....	31
1.5.2.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	32
1.6 Farmacoterapia do DM2 e aumento do risco cardiovascular.....	35
1.7 Alternativas Terapêuticas.....	37
2. OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo geral	39
2.2 Objetivos específicos	39
3. MÉTODOS.....	40
3.1 Modelo Experimental	40
3.2 Divisão dos grupos experimentais	40
3.3 Indução do diabetes experimental.....	40
3.4 Tratamento com carqueja.....	41
3.5 Registros eletrocardiográficos	41
3.6 Cálculo dos índices de hipertrofia.....	43
3.7 Análise Estatística.....	44
4. RESULTADOS	45

4.1	Peso Corporal.....	45
4.2	Peso dos corações.....	45
4.3	Comprimento da tíbia	46
4.4	Índices de hipertrofia cardíaca	46
4.4.1	Razão peso do coração / peso corporal	46
4.4.2	Razão peso do coração / comprimento da tíbia.....	47
4.5	Análise eletrocardiográfica	48
4.5.1	Parâmetros eletrocardiográficos.....	48
4.5.2	Variabilidade da frequência cardíaca.....	52
4.5.2.1	Índices no domínio do tempo.....	52
4.5.2.2	Índices no domínio da frequência.....	53
5.	DISCUSSÃO	55
6.	CONCLUSÃO.....	63
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCVs), de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), são a principal causa de mortalidade mundial (Mendis *et al.*, 2011). Em 1990, promoveram 14,4 milhões de óbitos (Fuster e Kelly, 2010), e mesmo com a redução na mortalidade apresentada nos últimos anos pelos países desenvolvidos, ainda são responsáveis por 31% de todos os óbitos ao redor do mundo, gerando 17,3 milhões de mortes anuais (WHO, 2017). Estima-se que em 2030, esse número aumente para 23,6 milhões (Guo *et al.*, 2016; WHO, 2017).

A frequente exposição aos fatores de risco está relacionada ao aumento da incidência e prevalência mundial das DCVs (Fuster e Kelly, 2010). Podem ser citados como fatores de risco a hipertensão arterial, a dislipidemia, o diabetes *mellitus* (Radovanovic *et al.*, 2014), a doença renal crônica (Guo *et al.*, 2016), a síndrome metabólica (Waltenberger *et al.*, 2016), a inatividade física, a obesidade, e o tabagismo (Fuster e Kelly, 2010).

Do ponto de vista nutricional, outro fator de risco é o uso excessivo de álcool, e o consumo de alimentos industrializados, ricos em ácidos graxos saturados, com alto teor de sódio, carboidratos e, portanto, com alta taxa calórica, ocasionando o fenômeno denominado transição nutricional que reflete a ampla adoção do consumo destes produtos, característico dos países em desenvolvimento e da cultura ocidental (Fuster e Kelly, 2010).

Além disso, mesmo nos países desenvolvidos, com alta renda, onde tem ocorrido redução da incidência das DCVs nos últimos anos, o aumento da sobrevivência após eventos cardiovasculares implica no aumento da sua prevalência (Fuster e Kelly, 2010), em virtude deste índice epidemiológico consistir como um reflexo da ocorrência dessa doença na população, averiguando o número de indivíduos afetados e contabilizando tanto casos antigos quanto recentes (Wagner, 1998).

Por serem um problema de saúde pública com alta incidência e prevalência, as DCVs geram grande impacto socioeconômico por provocarem mortes prematuras, definido pela OMS como sendo as que ocorrem entre 30 e 70 anos de idade (Roth *et*

al., 2015). Isso promove alto custo financeiro em função da faixa etária de seu acometimento (classificada como economicamente produtiva) e da mortalidade precoce (Cardoso *et al.*, 2011). Somado a isso, existem também os gastos com a terapêutica adotada como tratamento para os acometidos por DCVs, sendo esta farmacológica, intervencionista, assistencialista ou paliativa, além de custos de internação e com aposentadorias precoces por invalidez (Cardoso *et al.*, 2011) geradas pelas suas morbidades incapacitantes (Pittella e Duarte, 2002), o que, em algumas regiões do mundo, é inacessível para a maioria da população (Fúster, 2010).

Como consequência, a OMS estima a persistência dos acometimentos por DCVs e o aumento de sua morbimortalidade, gerando um agravamento da condição atual (Sposito *et al.*, 2007). Contudo, existe um plano de ação global para prevenção e controle das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (grupo no qual se inclui as DCVs, alguns tipos de câncer, doenças respiratórias crônicas e o diabetes *mellitus*) que possui como alvo a redução de 25% dos casos de morte prematura até 2025 (Roth *et al.*, 2015).

O investimento em medidas profiláticas para as doenças cardiovasculares gera grande benefício social, redução de gastos e melhoria na qualidade de vida da população (Cardoso *et al.*, 2011). Para isso, pode-se utilizar como estratégia, o diagnóstico precoce, a prevenção, o controle e o tratamento dos fatores de risco das DCVs (Radovanovic *et al.*, 2014), visto que estes são conhecidos e em sua maioria evitáveis, principalmente, a hipertensão arterial sistêmica, o sedentarismo, o tabagismo, a obesidade e o diabetes *mellitus* (Achutti, 2012).

Além disso, outra estratégia que objetiva reduzir a incidência das DCVs consiste no diagnóstico precoce das alterações do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) visto que ele possui um papel crucial no desenvolvimento e na progressão dessas doenças (La Rovere e Christensen, 2015).

1.2 Sistema Nervoso Autônomo e as Doenças Cardiovasculares

O controle autonômico cardiovascular é realizado através de um dos componentes do Sistema Nervoso Periférico, denominado Sistema Nervoso Autônomo (Rolim *et al.*, 2008). O SNA controla as atividades viscerais do organismo (Nunes *et al.*, 2007), através de conexões nervosas e neurônios que inervam glândulas, musculatura lisa de vísceras e vasos sanguíneos (Campos, 2014). Ele exerce efeitos importantes na modulação da eletrofisiologia cardíaca, visto que, é capaz de controlar a frequência cardíaca, a condução dos estímulos, a hemodinâmica e processos celulares dos miócitos (Shen e Zipes, 2014).

O SNA é subdividido em Sistema Nervoso Simpático (SNS) e em Sistema Nervoso Parassimpático (SNP). Estes se diferem com relação ao neurotransmissor utilizado, ao local de origem das fibras pré-ganglionares e na distribuição das fibras pós-ganglionares. O SNS, também denominado de sistema toracolombar, recebe essa segunda denominação em virtude das suas fibras pré-ganglionares se originarem dos segmentos toracolombares, ao passo que o SNP possui fibras que emergem do tronco cerebral e do segmento sacral, sendo conhecido como crâniosacral. No entanto, apesar das origens diferentes, ambos os neurônios pré-ganglionares secretam acetilcolina. Com relação às fibras pós-ganglionares, no SNS elas se difundem por todo corpo e liberam noradrenalina como neurotransmissor, enquanto no SNP elas se restringem aos órgãos viscerais liberando acetilcolina (Campos, 2014).

A regulação da função cardíaca através do SNA ocorre de duas formas, através da via intrínseca e da via extrínseca. Na via extrínseca, ocorre uma mediação entre o sistema nervoso e o coração, o que é mediado pelo SNS e SNP, ao passo que a via intrínseca está relacionada às fibras nervosas do saco pericárdico, que consiste no próprio sistema de condução elétrica cardíaca (Shen e Zipes, 2014). Um esquema da atuação da via extrínseca a nível cardíaco pode ser visualizado na figura 1.

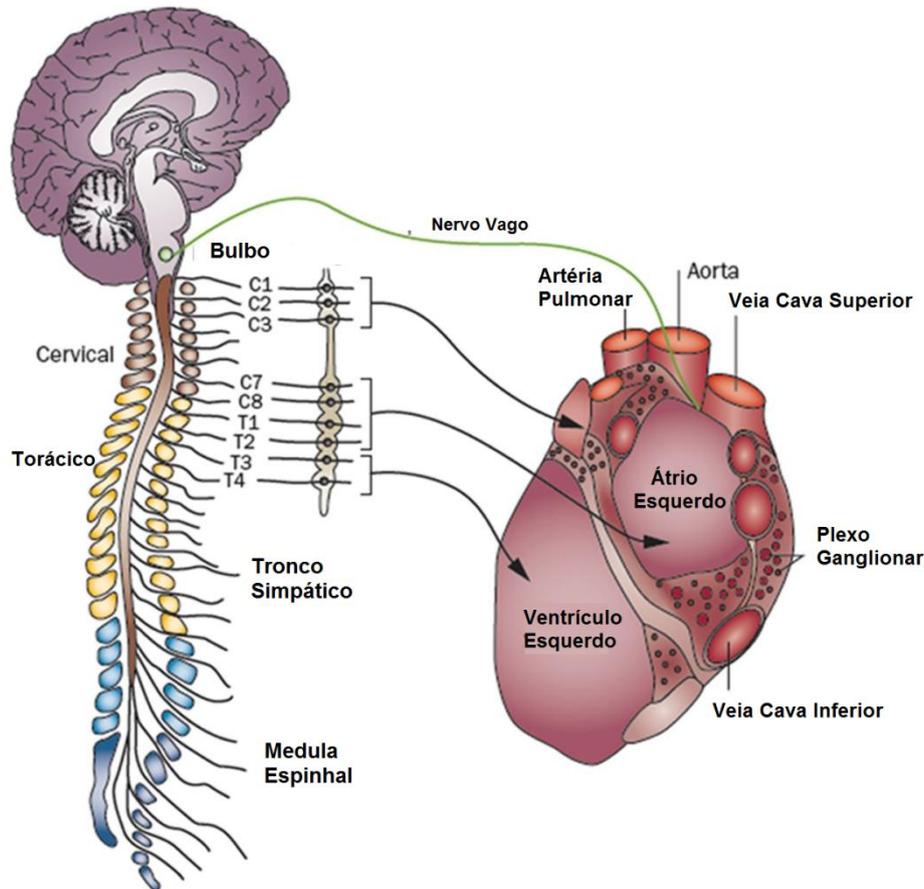


Figura 1: Anatomia do Sistema Nervoso Autônomo.

As fibras eferentes do SNA fazem sinapse em um gânglio autônomo e, posteriormente, seus axônios pós-ganglionares formam um plexo ao redor do órgão-efetor, evidenciado como o coração. O plexo cardíaco é composto principalmente por três nervos cardíacos cervicais do sistema nervoso autônomo simpático, que emergem dos três gânglios paravertebrais da porção cervical do tronco simpático. Ressalta-se também a inervação do nervo vago, do sistema parassimpático, que atua sobretudo no nodo sinusal situado no átrio direito. Existe pouca inervação parassimpática destinada aos ventrículos, podendo ser considerada inexistente. Adaptado de: Shen e Zipes, 2014.

O balanço simpatovagal, que decorre do equilíbrio das estimulações desses dois sistemas, é responsável por modular a função do nodo sinusal, promovendo ajustes na frequência cardíaca (FC), na função ventricular, alterando os volumes sistólico e diastólico finais, e nos vasos sanguíneos, contribuindo para a resistência vascular periférica (Rolim *et al.*, 2008).

Em processos fisiológicos normais, há interação constante entre o tônus simpático e parassimpático, de forma que, quando um está ativado, o outro automaticamente está inibido. Dessa forma, por exemplo, o SNS é responsável por aumentar a frequência cardíaca, a contratilidade miocárdica e a resistência vascular periférica. Enquanto que o SNP reduz a FC, porém com um efeito limitado na contratilidade cardíaca (La Rovere e Christensen, 2015).

Essas mudanças ocorrem porque, em um coração saudável, isto é, sem nenhuma doença ou alteração pré-existente, a ativação simpática promove redução da duração do potencial de ação e da dispersão transmural da repolarização. No entanto, em situações patológicas como Insuficiência Cardíaca e Síndrome do QT longo, o mesmo aumento do tônus simpático é capaz de aumentar a dispersão da repolarização, induzindo a ocorrência de arritmias (Shen e Zipes, 2014). Devido a essas manifestações, o aumento exacerbado da atividade simpática é estabelecido como pró-arritmogênico tanto a nível atrial quanto ventricular, enquanto que o aumento da atividade parassimpática parece ter um efeito benéfico e protetor apenas na câmara ventricular, prevenindo principalmente a indução de fibrilação ventricular (La Rovere e Christensen, 2015), porém, sendo considerada pró-arrítmica nos átrios devido à redução do seu período refratário efetivo (Shen e Zipes, 2014).

Tais modificações no equilíbrio existente entre SNS e SNP refletem a disfunção autonômica, que é um distúrbio originário de alterações nos componentes do SNA. Os mecanismos responsáveis por gerá-la são complexos e podem envolver múltiplas estruturas, incluindo alterações degenerativas, inflamatórias, isquêmicas e metabólicas, comprometendo a inervação intrínseca cardíaca e de outras estruturas do SNA. Esse acometimento pode ser gerado de forma secundária a diversas doenças, como por exemplo, doença de Chagas, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica, hipertensão arterial, hanseníase, alcoolismo, infarto agudo do miocárdio e diabetes *mellitus* (Junqueira Jr, 1998).

E como a desregulação autonômica cardiovascular, por possuir um potencial arritmogênico, pode gerar a ocorrência de fibrilação atrial, taquiarritmias ventriculares e de morte súbita (Shen e Zipes, 2014), torna-se extremamente necessário identificar o início da ocorrência de processos patológicos que afetam o SNA assim como identificar previamente as doenças capazes de causar secundariamente esses distúrbios, como o Diabetes *Mellitus*, prevenindo e tratando essas doenças para que haja redução da morbimortalidade causada pelas DCVs (De Angelis *et al.*, 2004).

1.3 Diabetes *Mellitus* tipo 2

De acordo com a Associação Americana do Coração (do inglês, *American Heart Association*), existem sete fatores de comportamento controláveis que são capazes de prevenir o desenvolvimento das doenças cardiovasculares, e são estes o controle da pressão arterial, do colesterol, do tabagismo, da obesidade, da dieta inadequada, do sedentarismo e da glicemia, sendo esta última ideal abaixo de 100mg/dL (Lloyd-Jones *et al.*, 2010). Dentre esses, o controle glicêmico se associa diretamente ao Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2), doença classificada como maior fator de risco para as DCVs (Mozaffarian *et al.*, 2015), podendo predispor, por exemplo, a fibrilação atrial, a insuficiência cardíaca, o acidente vascular encefálico, a doença arterial coronariana e a doença arterial periférica (Benjamin *et al.*, 2017).

A prevalência do diabetes tem aumentado de forma expressiva em todo o mundo, passando de 4,7% em 1980, o que representava 108 milhões de pessoas, para 8,5% em 2014, sendo equivalente a 422 milhões de acometidos, como pode ser visto na figura 2 (Zghebi *et al.*, 2017). Essa tendência a aumento da prevalência ocorre devido ao crescimento e envelhecimento da população (Roglic, 2016) e à exposição aos fatores de risco, cujo principal, no caso do DM2, é a obesidade (WHO, 2016).

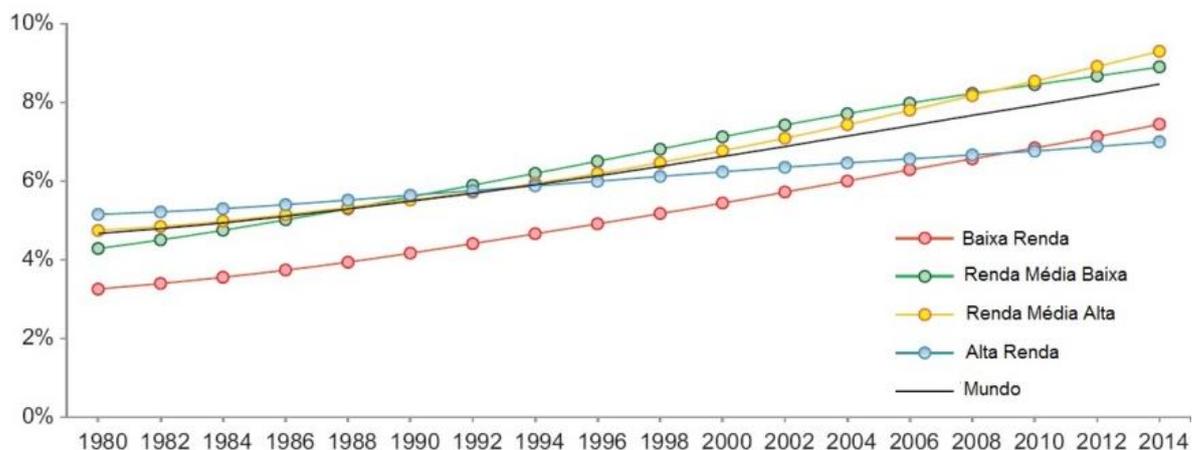


Figura 2: Prevalência do Diabetes *Mellitus*.

Tendência na prevalência do diabetes *mellitus*, de 1980 a 2014, de acordo com a renda dos países. Adaptado de: Roglic, 2016.

Em 2000, o diabetes foi responsável por 1 milhão de óbitos, evoluindo para 1,6 milhões, em 2015. Como consequência, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, o diabetes passou a ser a sexta principal causa de morte no mundo (WHO, 2017), como pode ser observado na figura 3. Devido ao aumento de incidência e prevalência dessa doença crônica, considera-se que, na conjectura atual, há uma epidemia mundial de diabetes (Tabish, 2007), situação destinada a se agravar, visto que sua prevalência tende a aumentar para 300 milhões de pessoas em 2025 (Jacobson *et al.*, 2007).

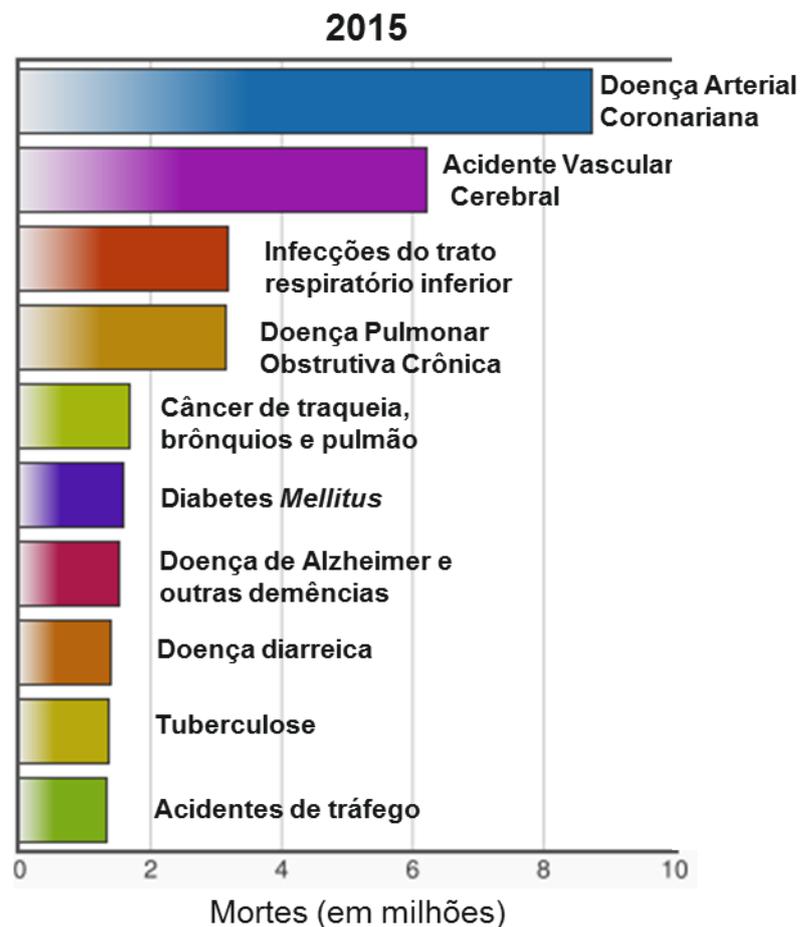


Figura 3: Dez principais causas de morte no mundo em 2015.

Adaptado de: WHO, 2017.

Como o diabetes é uma doença complexa e multifatorial, nem todos os indivíduos por ela acometidos são diagnosticados e tratados de forma precoce. Aproximadamente 23,4 milhões de adultos possuem diabetes diagnosticado, ao passo que 7,6 milhões possuem diabetes não diagnosticado. Ainda, cerca de 81,6 milhões possuem pré-diabetes (Benjamin *et al.*, 2017), que antecede em torno de 5

a 10 anos o desenvolvimento do diabetes *mellitus* (D'adamo e Caprio, 2011). Esse estágio geralmente é assintomático, demarcado por redução da tolerância a glicose, que pode ser visto através da glicemia de 140-200 mg/dL (no teste de tolerância oral à glicose), por alteração no exame de glicemia de jejum (com valores de 100-125mg/dL) e/ou por valores de hemoglobina glicada alterados (5,7-6,4%) (ADA, 2010).

De acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA, do inglês *American Diabetes Association*), recomenda-se verificar a possível existência desse quadro em todos os indivíduos a partir de 45 anos de idade, nos indivíduos que possuem sobrepeso ou obesidade (independente da faixa etária ou da ausência de sintomas), e nos que possuem um ou mais fatores de risco para o desenvolvimento do diabetes, como, por exemplo, dislipidemia, hipertensão e obesidade (principalmente abdominal). Este é um quadro passível de reversão caso haja dieta, atividade física e/ou tratamento monoterápico com metformina (ADA, 2016).

Outro fator determinante da heterogeneidade dessa doença é a existência de vários tipos de diabetes. Dentre os quais estão o diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), o tipo 2 (Kalra *et al.*, 2015), o tipo 3 (DM3) (De La Monte e Wands, 2008), o diabetes autoimune latente em adultos (DALA) (Calsolari *et al.*, 2008), o diabetes com início na maturidade do jovem (DIMJ) (Kalra *et al.*, 2015), o diabetes *mellitus* gestacional (DMG) e os que ocorrem de forma secundária (ADA, 2016).

O DM1 se caracteriza por ser uma doença de caráter autoimune ou idiopático, no qual há ampla destruição das células β -pancreáticas e deficiência grave de insulina. O DM2, por sua vez, está associado ao fenômeno de resistência à insulina, com progressiva perda da capacidade secretória de insulina devido à exaustão pancreática (ADA, 2016). O DALA seria um tipo intermediário, com manifestações fenotípicas tanto do DM2 quanto do DM1, e com pico de incidência aos 35 anos, diferindo do que normalmente acontece com o diabetes *mellitus* tipo 2, diagnosticado comumente em adultos, e com o tipo 1, em jovens (Calsolari *et al.*, 2008).

Já o DIMJ, também denominado de MODY (do inglês, *maturity-onset diabetes young*) consiste em uma classe com vários subtipos de diabetes monogênico resultante de mutações gênicas, que podem gerar danos tanto em enzimas como a glicoquinase (MODY-2), quanto em fatores de transcrição que controlam a produção

de insulina, como por exemplo, o TNF-alfa, afetado pelo MODY-3. Inclusive, estima-se que cerca de 5% dos indivíduos diagnosticados como sendo portadores do DM1 e 10% dos DM2 possuam, na verdade, um tipo de MODY (Oliveira *et al.*, 2002).

Tem-se estabelecido, atualmente, uma relação entre o DM2 e a Doença de Alzheimer (DA), caracterizando o denominado DM3, visto que indivíduos com DM2 possuem duas vezes mais chances de desenvolver a DA. O DM2, ao gerar um estado de resistência central à insulina, assim como redução de sua produção e da expressão de receptores para esse hormônio no Sistema Nervoso Central (SNC), predisporia a ocorrência de Alzheimer (Kroner, 2009).

Já o DMG, detectado normalmente durante o segundo ou terceiro trimestre de gestação, é definido como intolerância a carboidratos que se desenvolve durante a gravidez, na qual, cerca de 20 a 50% das mulheres que a possuem, desenvolvem DM2 posteriormente (Chen *et al.*, 2009). Além disso, o diabetes pode ser causado de forma secundária a endocrinopatias e desordens que afetam diretamente o pâncreas, como a fibrose cística, ou ao uso de determinados medicamentos, como os glicocorticoides (ADA, 2016).

Apesar dos demais tipos, o DM2 permanece sendo responsável por 90-95% de todos os casos diagnosticados de diabetes em adultos (Benjamin *et al.*, 2017). Esse agravo à saúde torna-se ainda mais acentuado em virtude da prevalência dessa doença estar aumentando significativamente na população pediátrica (D'adamo e Caprio, 2011). Estima-se que 186 mil pessoas menores de 20 anos de idade possuam diabetes. Atualmente, cada vez mais jovens, sobretudo crianças, têm sido diagnosticados como portadores de DM2, que comumente era diagnosticada em adultos com mais de 40 anos de idade (Mozaffarian *et al.*, 2015). Dessa forma, o tempo de exposição à doença aumenta consideravelmente, e atrelado a isso, amplia-se o desenvolvimento das complicações crônicas do diabetes, responsáveis diretamente por sua morbimortalidade (Cortez *et al.*, 2015).

1.4 Complicações do Diabetes *Mellitus*

Parte da mortalidade causada pelo DM ocorre como repercussão do desenvolvimento de suas complicações, que podem ser agudas ou crônicas. Dentre as agudas, pode-se citar a hipoglicemia, o estado hiperglicêmico hiperosmolar e a cetoacidose diabética (Cortez *et al.*, 2015). Já as crônicas podem ser divididas em macrovasculares (alterações em grandes vasos) e microvasculares (alterações em pequenos vasos), ambas desencadeadas pelo estado de hiperglicemia crônica (Ferreira *et al.*, 2011).

Dentre as complicações macrovasculares estão a Doença Vascular Periférica (DVP), a Doença Arterial Coronariana (DAC), o Acidente Vascular Encefálico (AVE), e com relação às microvasculares, existem a Neuropatia, Nefropatia e Retinopatia Diabética (Ferreira *et al.*, 2011), como pode ser visto na figura 4. Além disso, também se classificam como complicações do DM, o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), a Cardiopatia Isquêmica (Cortez *et al.*, 2015), disfunções neurológicas e Hipertensão Arterial Sistêmica (Pinhas-Hamiel e Zeitler, 2007).

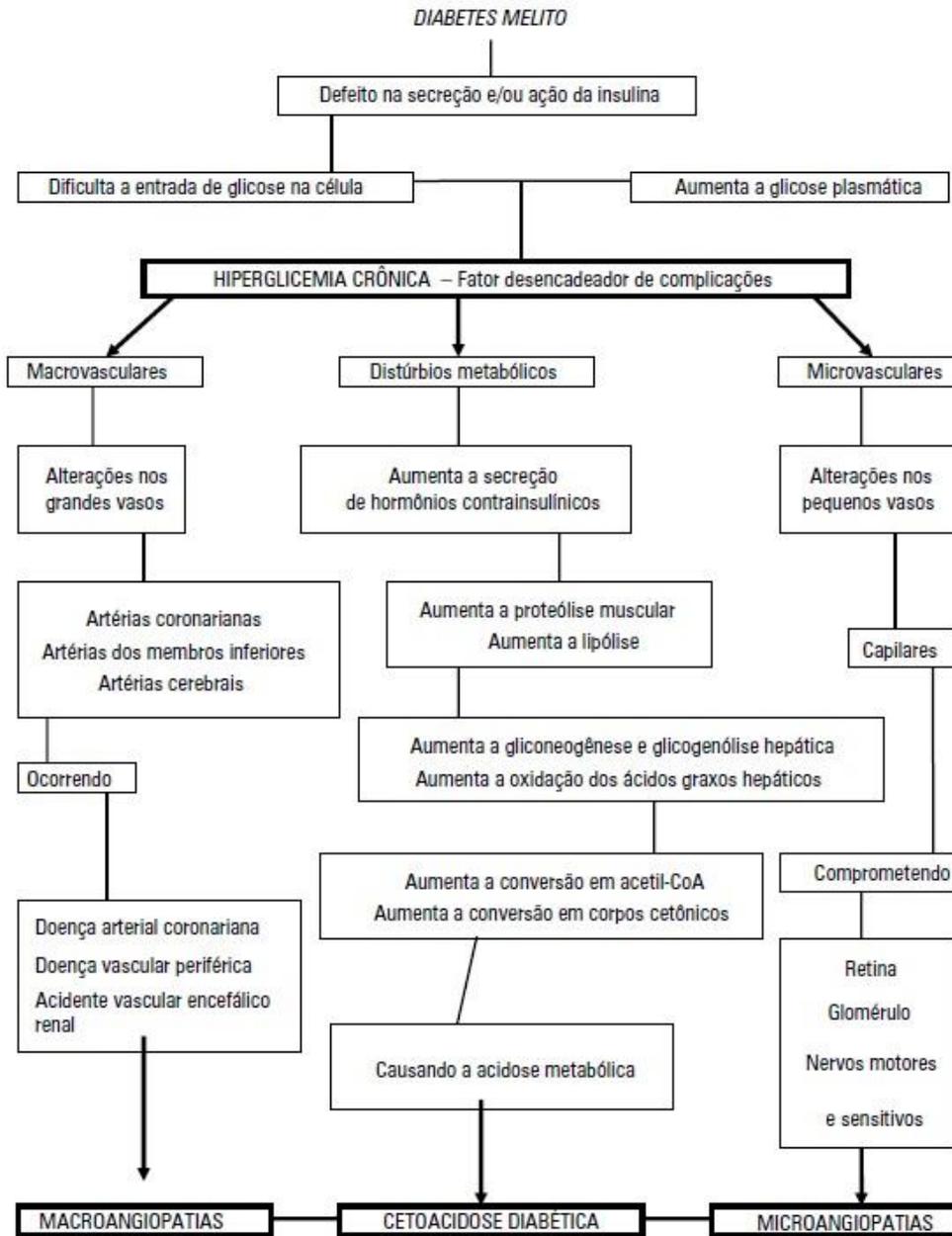


Figura 4: Complicações Agudas e Crônicas desencadeadas pelo Diabetes *Mellitus*.
Adaptado de: Ferreira *et al.*, 2011.

1.5 Neuropatia Diabética

O DM2 é a quinta maior indicação de hospitalização no Brasil (Carolino *et al.*, 2008), e a neuropatia diabética (ND) contribui de forma significativa para isso, visto que, dentre todas as complicações microvasculares, a ND é a que possui maior prevalência, aumentando significativamente o número de internações, de amputações e de incapacidade dos pacientes diabéticos (Nascimento *et al.*, 2016).

A ND é um grupo de alterações que acometem o Sistema Nervoso Periférico, de forma sintomática ou assintomática (Nascimento *et al.*, 2016). Pode ser dividida em duas grandes classes, a simétrica e assimétrica, podendo acometer diversos órgãos e sistemas, promovendo disautonomia cardiovascular, genitourinária (gerando incontinência urinária, bexiga neurogênica e disfunção erétil), gastrointestinal (promovendo diarreia, obstipação e gastroparesia), sudomotora, anormalidades pupilares, entre outras disfunções (Bansal *et al.*, 2006; Rolim *et al.*, 2008).

A Neuropatia Autonômica Cardiovascular (NAC) é uma das manifestações da forma simétrica, que resulta da lesão das fibras nervosas autonômicas que inervam o coração e os vasos sanguíneos (Foss-Freitas *et al.*, 2008), promovendo alteração no controle autonômico cardiovascular (Duque *et al.*, 2013).

1.5.1 Neuropatia Autonômica Cardiovascular

A NAC possui 46% de prevalência nos indivíduos que possuem DM diagnosticados com tempo inferior a cinco anos, e essa porcentagem aumenta para 70% quando o tempo de exposição à doença é maior do que 20 anos (Bissinger *et al.*, 2011). Frequentemente, a NAC se apresenta de forma subclínica, agravando seu potencial de mortalidade já que não é detectada precocemente (Foss-Freitas *et al.*, 2008).

Portanto, é extremamente necessário o estudo das alterações fisiopatológicas induzidas pela NAC, a fim de rastrear seu desenvolvimento, promover o acompanhamento do indivíduo por ela acometido e retardar sua evolução. Dentre essas alterações, estão a disautonomia cardiovascular, promovida pela destruição progressiva das fibras nervosas do Sistema Nervoso Autônomo, gerado pela

ativação da proteína quinase C e da via poli-ol, e pelo aumento do estresse oxidativo e da geração de produtos finais de glicação avançada (AGEs, do inglês *Advanced Glycation End-Products*), todos decorrentes do estado de hiperglicemia crônica (Duque *et al.*, 2013).

O comprometimento se inicia pelo nervo vago, promovendo perda do tônus parassimpático (Duque *et al.*, 2013), isso gera a taquicardia sinusal de repouso, um dos primeiros sintomas dos acometidos pela NAC, e redução da Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) (Foss-Freitas *et al.*, 2008). Em seguida, os nervos simpáticos são comprometidos, no sentido do ápice à base do coração (Duque *et al.*, 2013), o que faz com que a frequência cardíaca possa retornar ao normal, porém, seu ajuste fisiológico é perdido (Foss-Freitas *et al.*, 2008).

Outra alteração importante, causada pela NAC, é a alteração na repolarização ventricular visualizada pelo aumento do intervalo QT e QT corrigido do eletrocardiograma, favorecendo a arritmogênese e aumentando o risco de morte súbita (Foss-Freitas *et al.*, 2008). Além de também existirem manifestações como hipertrofia ventricular esquerda (HVE) e disfunção sistólica e diastólica do VE, gerando o desenvolvimento da cardiomiopatia diabética (Duque *et al.*, 2013; Tannuse, 2015).

Outras manifestações precoces são a hipotensão ortostática grave, a síncope, a intolerância ao exercício (devendo ser necessária cautela durante sua prescrição, visto que o aumento do débito cardíaco durante a atividade física fica prejudicado), isquemia e IAM silenciosos, redução da resposta respiratória à hipóxia, além de aumento do risco de desenvolvimento de complicações crônicas renais e de DCVs (Rolim *et al.*, 2008; Tannuse, 2015).

1.5.2 Avaliação das alterações da NAC

A NAC pode existir como complicação tanto do tipo 1 quanto do tipo 2 do diabetes, no entanto, no DM2, ela possui maior prevalência, maior mortalidade, evolui mais rapidamente e ocorre de forma mais precoce. Como seus sintomas possuem a característica de poderem estar ausentes ou oscilantes, é comum que indivíduos portadores de DM2 possuam NAC com uma alta frequência, porém de forma assintomática. Portanto, é extremamente necessário realizar testes que possibilitem o diagnóstico da NAC de forma precoce, enquanto ainda há alterações iniciais e reversíveis, objetivando melhorar o prognóstico dos acometidos (Rolim *et al.*, 2008).

Apesar de não haver um padrão ou protocolo para o diagnóstico da NAC, existem alguns testes clínicos que avaliam reflexos autonômicos cardiovasculares, e podem auxiliar no diagnóstico e no acompanhamento dos indivíduos acometidos por essa complicação, são estes a manobra de valsalva, a razão da frequência cardíaca na respiração profunda (equivalente a teste da arritmia sinusal respiratória), o teste da resposta da frequência cardíaca à mudança de decúbito (sinônimo de teste da razão 30/15), o teste de contração isométrica sustentada (também chamado de teste da preensão), o teste de hipotensão postural (ou teste da variação da pressão) e o teste postural passivo (ou teste de Tilt) (Boer *et al.*, 1998; Foss-Freitas *et al.*, 2008).

Destes, os cinco primeiros são classificados como Testes de Ewing, descritos inicialmente por Ewing e colaboradores em 1973 (Ewing *et al.*, 1973), enquanto os três primeiros testes são recomendados pela ADA e pela Associação Americana de Neurologia, devendo ser realizados no momento do diagnóstico em portadores de DM2, e cinco anos após o diagnóstico no DM1, repetindo-se anualmente (Rolim *et al.*, 2008).

Os testes supracitados possuem alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (Boer *et al.*, 1998) e são considerados o padrão ouro para avaliar a NAC (Voulgari *et al.*, 2011), no entanto, são testes ambulatoriais e, portanto, aplicáveis a humanos, porém, não em pesquisas realizadas em animais. Outra forma de se avaliar as alterações autonômicas presentes na NAC é a análise direta da Variabilidade da Frequência Cardíaca (Jacobson *et al.*, 2007; Rolim *et al.*, 2008) e do Eletrocardiograma (Vanhoose *et al.*, 2010; Voulgari *et al.*, 2011).

1.5.2.1 Eletrocardiograma

A eletrocardiografia é uma técnica que foi introduzida por Willem Einthoven em 1903, amplamente utilizada como exame complementar ao diagnóstico na prática clínica e que reflete, através da atividade elétrica, características funcionais e estruturais cardíacas. Apesar de algumas diferenças (que serão abordadas posteriormente), existem muitas similaridades entre o registro eletrocardiográfico de humanos e ratos, possibilitando sua utilização em pesquisa básica, realizada *in vivo*, para inúmeros estudos sobre fisiologia cardíaca e doenças cardiovasculares (Konopelski e Ufnal, 2016).

O eletrocardiograma (ECG) é um método rápido, não invasivo, que permite a avaliação das alterações decorrentes do diabetes *mellitus* e a detecção precoce das DCVs nos indivíduos portadores dessa doença (Voulgari *et al.*, 2011). É uma técnica com ampla utilização atualmente, devido a sua disponibilidade, reprodutibilidade, fácil interpretação e custo relativamente baixo (Povoa e Souza, 2008).

O registro clássico do ECG pode ser realizado em doze derivações, sendo seis periféricas e seis precordiais. A partir dele, pode-se avaliar as ondas, segmentos, intervalos e complexos disponíveis, dentre as quais estão a onda P, o intervalo PR, o complexo QRS, o intervalo QT e QT corrigido, a onda T, o intervalo Tp-e e a frequência cardíaca, cujas formações obedecem a propagação do estímulo elétrico pelas estruturas cardíacas (Neto, 1948).

O nodo sinusal, por ser um conjunto de células que possuem automatismo, gera um impulso elétrico que será distribuído pelos átrios, formando a onda P, que representa a despolarização atrial. Esse impulso chega até o nodo atrioventricular, sendo distribuído pelo feixe de His e pelas fibras de Purkinje, gerando a despolarização ventricular, que é representado no ECG pelo complexo QRS (resultante das ondas Q, R e S), em seguida, ocorre a repolarização ventricular, que é representada pela onda T, conforme pode ser visto na figura 6 (Vanderlei *et al.*, 2009).

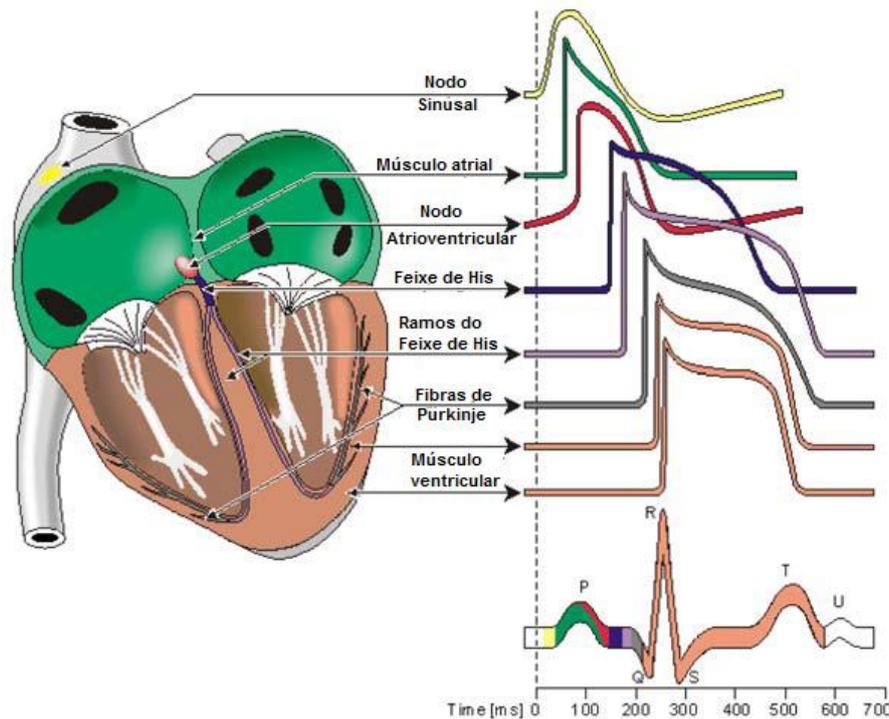


Figura 5: Propagação dos estímulos elétricos pelas estruturas cardíacas e seus respectivos potenciais de ação.

Propagação do estímulo elétrico se iniciando pelo nódo sinusal, percorrendo o nódo atrioventricular, o feixe de His e as fibras de Purkinje, à esquerda. Respective potenciais de ação das estruturas cardíacas, formando, em conjunto, o traçado do eletrocardiograma, à direita. Adaptado de: Tarvainen e Niskanen, 2006.

Alterações no registro eletrocardiográfico estão relacionadas à diversas patologias, inclusive com o desenvolvimento da NAC. Dentre essas alterações, ressalta-se o aumento da amplitude da onda R, prolongamento do intervalo QT, QT corrigido (QTc) e da dispersão do QT, aumento da duração do complexo QRS, da duração da onda P, do intervalo PR e da amplitude da onda T, alterações promovidas devido a hipertrofia ventricular esquerda e aterosclerose, o que reforça o diagnóstico de cardiomiopatia diabética. Além de haver redução da VFC, cuja análise também é obtida através do ECG (Voulgari *et al.*, 2011).

1.5.2.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca

A Variabilidade da Frequência Cardíaca é uma medida simples, de baixo custo e não-invasiva que permite a análise de oscilações dos intervalos entre batimentos cardíacos consecutivos (Vanderlei *et al.*, 2009). Estes intervalos, denominados de

intervalos RR (isto é, entre ondas R subsequentes no eletrocardiograma) não possuem uma regularidade fixa (figura 5), sofrendo mudanças a partir de estímulos ambientais, fisiológicos e até patológicos, como por exemplo, o estresse, a atividade física, a respiração, o sono e algumas doenças, devido às mudanças que esses fatores geram no SNA, que através do nodo sinusal, promove alteração na FC (Lopes *et al.*, 2013).



Figura 6: Oscilações dos intervalos entre batimentos cardíacos consecutivos em milissegundos.

Adaptado de: Polar®, 2017.

Dessa forma, a VFC consiste em um marcador da função autonômica cardíaca, que permite a classificação dos indivíduos de acordo com o risco cardiovascular (Stuckey e Petrella, 2013). A sua redução está associada ao aumento do risco cardiovascular, atuando como um índice preditor de doenças ou efeitos adversos, enquanto seu aumento relaciona-se a um bom funcionamento fisiológico do organismo, relacionando-se à uma regulação autonômica cardiovascular eficiente (Vanderlei *et al.*, 2009).

A VFC pode ser analisada a partir dos métodos lineares e não lineares (Lopes *et al.*, 2013). Dentre os métodos não lineares estão a função de correlação, o expoente de Lyapunov, o expoente de Hurst, a análise de flutuações depuradas de tendências e a dimensão fractal. No entanto, apesar desses índices serem bons marcadores do grau de morbimortalidade, necessitam de um longo período de tempo com grande quantidade de intervalos RR (aproximadamente 1000, por exemplo) para análise (Vanderlei *et al.*, 2009).

Com relação aos métodos lineares, pode-se dividi-los em dois grupos, os analisados no domínio do tempo e no domínio da frequência (Vanderlei *et al.*, 2009).

A análise no domínio do tempo pode ser realizada em um período de tempo mais curto (10 minutos, por exemplo), e pode ser subdividida em índices estatísticos e geométricos. Os índices geométricos incluem o índice triangular e o plot de Poincaré sendo este último uma análise subjetiva da distribuição dos intervalos RR (Lopes *et al.*, 2013).

Dentre os índices estatísticos do domínio do tempo estão a média dos intervalos RR (MNN), que está relacionado à frequência cardíaca, o desvio padrão dos intervalos RR normais (SDNN) que está relacionado à atividade simpática e parassimpática, a raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes (rMSSD) e o percentual de intervalos RR que diferem mais do que 5 milissegundos de seu adjacente (pNN5), ambos relacionados à atividade parassimpática (Vanderlei *et al.*, 2009).

Já os índices no domínio da frequência podem ser analisados através da transformação rápida de Fourier, que é um algoritmo matemático capaz de converter a VFC, proveniente do balanço autonômico, em faixas de frequência (Rolim *et al.*, 2008). Essas faixas de frequência, em humanos, são divididas em muita baixa frequência (0.0-0.04 Hz), baixa frequência (0.04-0.15 Hz) e alta frequência (0.15-0.4 Hz) (Silva *et al.*, 2009), e estão relacionadas, respectivamente, à termorregulação e ao sistema renina-angiotensina-aldosterona, ao sistema simpático, e ao sistema parassimpático. A análise dessas faixas espectrais já é, inclusive, utilizada atualmente para diagnóstico da NAC (Rolim *et al.*, 2008).

Várias doenças estão associadas a redução da VFC, dentre essas, pode-se citar a epilepsia, a anorexia nervosa, a asma, a obesidade (Lopes *et al.*, 2013), a HAS, o IAM, a insuficiência coronariana, a aterosclerose (Vanderlei *et al.*, 2009) e o DM2 (Stuckey e Petrella, 2013; Tarvainen *et al.*, 2013).

Pacientes com DM2 podem apresentar aumento do componente de baixa frequência (atividade simpática) e redução do componente de alta frequência (atividade parassimpática), gerando conseqüente aumento na razão entre ambos (índice simpatovagal), sugerindo desbalanço autonômico (Hari Babu e Muralikrishnan, 2016). No entanto, em decorrência da própria evolução da NAC, pode haver ampla disfunção simpática, reduzindo também os componentes de baixa frequência e muita baixa frequência, o que ocorre mais tardiamente (Rolim *et al.*, 2008).

Por estar diretamente relacionado à hiperglicemia, identificar precocemente o desbalanço simpato-vagal na NAC pode mudar a estratégia de tratamento, pois sua presença representa um marcador de gravidade na evolução da doença (Tarvainen *et al.*, 2013). Com isso, a análise da VFC pode ser utilizada como ferramenta capaz de identificar os primeiros sinais da NAC, mesmo em indivíduos assintomáticos e sem evidências clínicas (Tarvainen *et al.*, 2013).

Achados precoces, tanto do eletrocardiograma quanto da variabilidade da frequência cardíaca, podem colaborar para redução da mortalidade associada à DM já que aproximadamente 75% desses doentes morrem por algum evento cardiovascular (Okoshi *et al.*, 2007). Sendo assim, tratar o diabetes *mellitus*, promovendo controle glicêmico adequado e eliminando a variabilidade glicêmica, pode impedir ou, ao menos, retardar a progressão das complicações crônicas. O tratamento correto e eficaz pode melhorar a qualidade de vida e a sobrevivência dos pacientes com DM, e conseqüentemente, reduzir a morbimortalidade causada pelas DCVs (Hirakawa *et al.*, 2014).

1.6 Farmacoterapia do DM2 e aumento do risco cardiovascular

O principal foco no tratamento do diabetes *mellitus* é o controle glicêmico. Para isso, diversas classes de fármacos podem ser empregadas destacando-se as biguanidas, os inibidores da alfa-glicosidase, as tiazolidinedionas, a insulina (Araújo *et al.*, 2000), análogos de GLP-1 (peptídeo semelhante ao glucagon), os inibidores da DPP-4 (dipeptidil peptidase 4), inibidores do SGLT-2 (co-transportador renal de sódio-glicose 2) as sulfoniluréias (DeFronzo, 2009).

Dentre esses, as sulfoniluréias são a classe mais antiga de hipoglicemiantes orais recomendada, e esses agentes são denominados de secretagogos de insulina, devido ao seu mecanismo de ação (Baldoni *et al.*, 2014). Elas atuam aumentando a liberação de insulina pelas células β -pancreáticas, o que promove redução da glicemia e da hemoglobina glicada. Porém, induz exaustão pancreática a longo prazo, devido ao processo de desdiferenciação e apoptose com redução da massa de células β -pancreáticas funcionais (Reno *et al.*, 2013; Kalra *et al.*, 2015).

As sulfoniluréias também podem promover ganho de peso como efeito secundário ao aumento na secreção de insulina. Como este é um hormônio anabólico, a elevação nos seus níveis séricos pode agravar o estado de resistência à insulina dos indivíduos com DM2. Além disso, as sulfoniluréias podem induzir a hipoglicemia, propiciando a ocorrência de arritmias cardíacas, com possíveis consequências letais (Reno *et al.*, 2013; Kalra *et al.*, 2015).

Contudo, apesar de seus efeitos hipoglicemiantes e sua ampla utilização no controle da DM2, a literatura tem demonstrado uma correlação entre as sulfoniluréias e o aumento do risco cardiovascular (Garratt *et al.*, 1999; Lin e Wright, 2000; Bell, 2006; Phung *et al.*, 2013; Abdelmoneim *et al.*, 2014; Baldoni *et al.*, 2014; Kalra *et al.*, 2015; Bain *et al.*, 2017; Ke *et al.*, 2017).

A sua ação farmacológica se dá pela ligação e inibição dos receptores de sulfoniluréias (SUR), como pode ser visto na figura 7. Existem três subtipos desses receptores (SUR1, SUR2A e SUR2B), ambos localizados nos canais de potássio sensível a adenosina trifosfato (K_{ATP}). SUR1 está situado na membrana das células β -pancreáticas, e quando inibido pela ligação do fármaco, impede o efluxo de potássio, gerando despolarização celular, com consequente influxo de cálcio que promove a exocitose das vesículas contendo insulina (Baldoni *et al.*, 2014; Kalra *et al.*, 2015).

O K_{ATP} também está situado na membrana plasmática e mitocondrial dos cardiomiócitos, onde se encontra SUR2A. Fisiologicamente, esse receptor está relacionado ao mecanismo de pré-condicionamento isquêmico. A ligação do fármaco a esses receptores induz a perda desse processo, que é inteiramente benigno para o coração. Através do SUR2B, as sulfoniluréias também podem inibir o relaxamento dos músculos lisos dos vasos, aumentando o risco cardiovascular (Baldoni *et al.*, 2014; Kalra *et al.*, 2015).

Em virtude disso, visto que o próprio tratamento para o DM2 pode aumentar o risco de mortalidade cardiovascular, faz-se necessário o estudo de novas alternativas terapêuticas que tenham múltiplas aplicabilidades, sejam acessíveis, de baixo custo, que possuam reduzidos efeitos colaterais e, principalmente, que sejam seguras do ponto de vista cardiovascular. Nesse âmbito, ressalta-se o estudo de plantas medicinais, que pode resultar na descoberta de agentes que atuam como alternativa ao tratamento do diabetes.

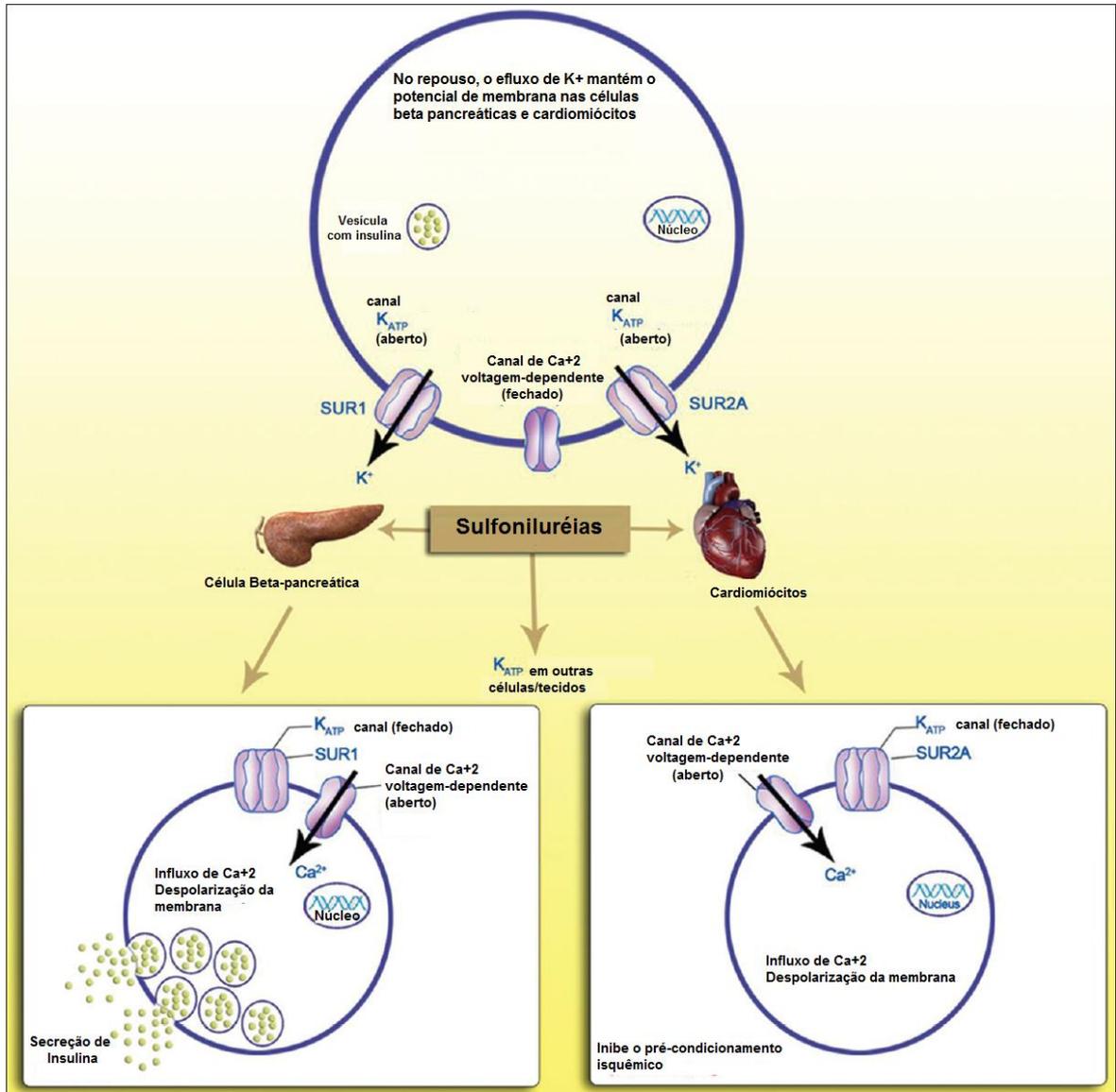


Figura 7: Mecanismo de ação das sulfonilurías nas células β -pancreáticas e cardiomiócitos.
Adaptado de: Kalra *et al.*, 2015.

1.7 Alternativas Terapêuticas

É notório o interesse industrial sobre produtos naturais como fonte para o desenvolvimento de novos fármacos fitoterápicos, mercado que está em atual expansão (Simões e Schenkel, 2002). Muitos medicamentos são provenientes de produtos naturais ou de seus derivados, e as pesquisas científicas nessa área continuam aumentando expressivamente (Waltenberger *et al.*, 2016). Torna-se promissor o investimento em plantas medicinais brasileiras, devido a sua alta disponibilidade, em virtude da ampla biodiversidade nacional (Funari e Ferro, 2005).

A boa aceitabilidade para o uso de plantas medicinais para tratamento de doenças está ligado ao fato de estas já estarem inseridas na cultura popular (Simões e Schenkel, 2002), visto que tem sido utilizadas pela medicina tradicional em alguns países há centenas de anos. Ademais, ressalta-se o seu baixo custo, a redução ou inexistência de efeitos colaterais, e suas múltiplas aplicações, reforçando seu valor terapêutico (Shukia *et al.*, 2000).

Inclusive, a metformina, medicamento da classe das biguanidas utilizado como hipoglicemiante oral para tratamento do DM2, é derivado de uma planta medicinal (*Galega officinalis*) utilizada tradicionalmente na Europa medieval para tratamento do diabetes, reforçando a imprescindibilidade de estudos nessa área (Shukia *et al.*, 2000).

Dentre as plantas medicinais que possuem efeito terapêutico para o tratamento do DM2 estão as espécies *Allium cepa*, *Allium sativum*, *Ficus bengalensis*, *Gymnema sylvestre*, *Pterocarpus marsupium* (Shukia *et al.*, 2000), *Agrimonia eupatoria* L. (Kuczmánová *et al.*, 2016), *Cuminum nigrum* (Mustafa *et al.*, 2016) e a *Baccharis trimera* (Karam *et al.*, 2013; Paiva *et al.*, 2015).

O gênero *Baccharis* pertence à família Asteraceae e possui 500 espécies, cuja principal é a carqueja (*Baccharis trimera*) (Karam *et al.*, 2013), uma planta nativa da América do Sul utilizada pela medicina popular para tratar doenças hepáticas e gastrointestinais, processos inflamatórios e diabetes (Paiva *et al.*, 2015). Já foi demonstrado seu efeito hipoglicemiante, anti-hipertensivo (Karam *et al.*, 2013) e antioxidante, que são os principais efeitos benéficos para o tratamento do DM2, além de possuírem atividade analgésica e antimutagênica (Paiva *et al.*, 2015).

Acredita-se que essas propriedades terapêuticas advenham dos flavonoides, que são os metabólitos secundários que estão em maior concentração nessa espécie. Ademais, a carqueja, apesar de possuir toxicidade moderada por via intraperitoneal, possui baixa toxicidade por via oral, sugerindo que seu uso ocorra através dessa via de administração (Karam *et al.*, 2013). No entanto, há uma escassez na literatura sobre pesquisas que averiguem os efeitos e a segurança dessa planta medicinal sobre o sistema cardiovascular de diabéticos e sobre as complicações dessa doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento crônico com óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera*) sobre a neuropatia autonômica cardiovascular diabética.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever os efeitos do tratamento crônico com óleo essencial de carqueja sobre a hipertrofia cardíaca em ratos diabéticos e não-diabéticos;
- Estudar os efeitos do tratamento crônico com óleo essencial de carqueja sobre os a repolarização ventricular de ratos diabéticos e não-diabéticos;
- Analisar os efeitos do tratamento crônico com óleo essencial de carqueja sobre a modulação autonômica de ratos diabéticos e não-diabéticos;
- Analisar o efeito do tratamento crônico com óleo essencial de carqueja sobre os índices da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e da frequência de ratos diabéticos e controles.

3. MÉTODOS

3.1 Modelo Experimental

No presente trabalho foram utilizados 20 ratos *Wistar*, machos, com 8 semanas de idade, pesando aproximadamente 250 gramas cada. Os animais foram comprados na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e mantidos no Biotério do Instituto Biomédico/UNIRIO durante todo o estudo. Aguardou-se até que os animais atingissem dois meses de idade para se iniciar a implementação das condições experimentais.

3.2 Divisão dos grupos experimentais

Os animais supracitados foram divididos randomicamente em quatro grupos experimentais: controle veículo (ContVei; N=5), controle tratado com carqueja (ContCar; N=4), diabético veículo (DMVei; N=4) e diabético tratado com carqueja (DMCar; N=5), subentendendo-se como controle todos os animais não diabéticos.

3.3 Indução do diabetes experimental

O diabetes *mellitus* foi induzido nos grupos DMVei e DMCar através da alimentação com uma ração hipercalórica denominada dieta de cafeteria (DCAF). A DCAF foi disponibilizada, *ad libitum*, durante três semanas. Após este período de sensibilização foi administrada uma única dose de 35mg/kg de estreptozotocina (STZ) por via intraperitoneal. Este protocolo, que consiste na associação de uma dieta hiperpalatável seguida pela administração da STZ em baixa dose, é suficientemente documentado para a correta indução do diabetes *mellitus* tipo 2 (Reed *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008; Skovsø, 2014; Qian *et al.*, 2015).

Durante todo o período de tratamento os animais tiveram acesso à comida e água *ad libitum* através de comedouros suspensos. Concomitantemente a indução do DM nos grupos diabéticos, os animais dos grupos controle receberam dieta padrão para roedores (ração Nuvilab®). Os animais foram pesados semanalmente.

A confirmação do DM2 ocorreu através de testes glicêmicos, realizados com o glicosímetro capilar (G-Tech ®), com amostras de sangue coletadas através da secção de vasos sanguíneos superficiais da região caudal dos ratos. Os animais submetidos ao protocolo para indução do DM2 apresentaram glicemia superior a 200mg/dL, enquanto os controles possuíam glicemia inferior a 99mg/dL. Após a confirmação do DM2, os ratos dos grupos DMVei e DMCar passaram a receber a dieta padrão para roedores (ração Nuvilab ®) até o término do protocolo.

3.4 Tratamento com carqueja

Os grupos que foram tratados com carqueja (ContCar e DMCar) receberam óleo essencial de carqueja amarga, obtido através da empresa Laszlo®. A administração crônica do óleo essencial de carqueja foi realizada por sondagem orogástrica intermitente (gavagem), na dose de 20 mg/kg/dia, durante três semanas. Os demais grupos (ContVei e DMVei) receberam volume equivalente de *Tween* 80 (co-emulsificador de óleo em água) em solução aquosa 0,01%, utilizado como veículo diluente do óleo essencial, a fim de mimetizar as condições de estresse as quais eram submetidos os ratos tratados com carqueja, além de verificar possíveis alterações de resultado induzidas pelo próprio agente solubilizante.

3.5 Registros eletrocardiográficos

O registro do ECG foi realizado através da derivação periférica e bipolar DII. Para isso, três eletrodos metálicos foram implantados cirurgicamente no tecido subcutâneo dos animais, após anestesia geral com tiopental sódico (40 mg/kg, *ip.*). O eletrodo negativo foi posicionado próximo ao membro superior direito, o positivo, na região lateral do membro inferior esquerdo e o eletrodo terra na região lateral do membro inferior direito. A diferença de polaridade entre os eletrodos do membro superior direito e inferior esquerdo (figura 8) permite a obtenção das deflexões características dessa derivação.

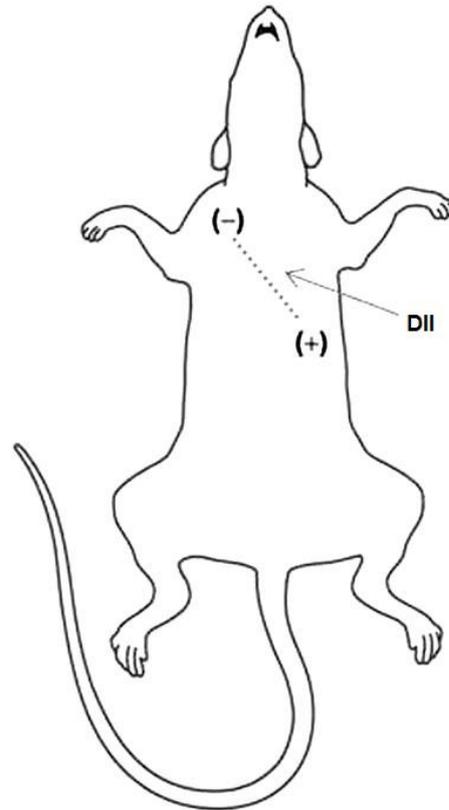


Figura 8: Disposição dos polos para obtenção do registro eletrocardiográfico na derivação DII, *in vivo*.
Adaptado de: Farraj *et al.*, 2011.

O registro contínuo do eletrocardiograma foi realizado 24 horas após o implante dos eletrodos, com os animais acordados. A amplificação do sinal foi realizada com amplificador diferencial (*Model 1700, A-M Systems*), conectado a um microcomputador através de uma interface análogo-digital (*TL-1 Interface, Axon Instruments*). Todos os registros foram armazenados de forma digital em um computador para posteriores análises, que foram realizadas através de um software específico (*LabChart 7.0 software, ADInstruments*).

Foram analisados, a frequência cardíaca (FC), a amplitude da onda P, do complexo QRS e da onda T. Também, a duração da onda P, da onda T, do intervalo entre o pico e o final da onda T (Tp-e, do inglês *Tpeak-Tend*), do complexo QRS, do segmento e intervalo PR, e do intervalo QT. Para minimizar o efeito da frequência cardíaca sobre o valor do intervalo QT, este foi corrigido (QTc) pela equação de Bazett ($QTc = QT/\sqrt{RR}$), onde RR é o intervalo entre duas ondas R consecutivas, dado em segundos.

Os intervalos RR obtidos em trechos de 30 segundos de registro sem interferência ou ruídos, cujo exemplo representativo se encontra na figura 9, foram utilizados para análise da variabilidade da frequência cardíaca. As variáveis no domínio do tempo, compostas pela mediana e média dos intervalos RR normais (MNN, do inglês *average of all normal-to-normal RR intervals*), percentual de intervalos RR normais que diferem mais que 5ms de seu adjacente (pNN5), desvio padrão de todos os intervalos RR normais registrados em um intervalo de tempo (SDNN, do inglês *standard deviation of all normal-to-normal RR intervals*) e a raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais consecutivos (rMSSD), e no domínio da frequência, sendo estes o componente de baixa frequência (LF, do inglês *low frequency*), muita baixa frequência (VLF, do inglês *very low frequency*) e alta frequência (HF, do inglês *high frequency*), além da razão entre os componentes de baixa e alta frequência, usado para calcular o índice simpatovagal (LF/HF).

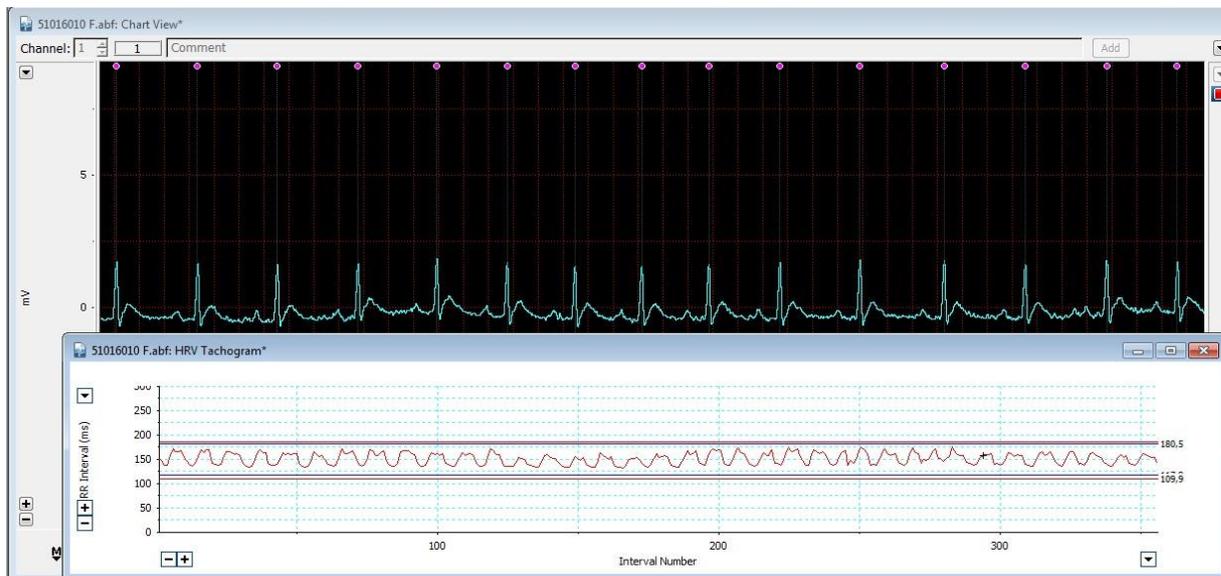


Figura 9: Representação do traçado do eletrocardiograma (parte superior da figura) usado para obtenção dos intervalos RR que formam o tacograma (parte inferior da figura).

3.6 Cálculo dos índices de hipertrofia

Concluídos os registros, os animais foram submetidos à eutanásia através de anestesia com tiopental sódico (80 mg/kg, *i.p.*) e punção cardíaca. Após eutanásia, cada animal teve o coração removido e pesado. O comprimento da tíbia também foi

mensurado em todos os animais de cada grupo experimental, sempre na tíbia esquerda, após dissecação do osso. A divisão do valor do peso do coração pelo peso corporal (HW/BW) e da divisão do peso do coração pelo comprimento da tíbia (HW/TL) foram utilizados como índices de hipertrofia cardíaca (Rodrigues Junior *et al.*, 2016).

3.7 Análise Estatística

Todos os índices analisados foram submetidos inicialmente ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para os parâmetros que passaram no teste de normalidade (isto é, peso final dos ratos, peso do coração, relação HW/BW e HW/TL; intervalo QT, intervalo QTc, FC, duração da onda P, intervalo PR, amplitude e duração da onda T, Tpeak-Tend; média e mediana dos intervalos RR, pNN5, VLF, HF e LF/HF) utilizou-se o teste paramétrico de análise de variância (*one-way ANOVA*), com pós teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações entre os grupos ContVei, ContCar, DMVei e DMCar. Ao passo que, para os índices que não passaram no teste de normalidade (ou seja, peso inicial dos ratos, comprimento da tíbia, complexo QRS, rMSSD, SDNN e LF) foi realizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns para múltiplas comparações entre os grupos ContVei, ContCar, DMVei e DMCar. A partir dessas análises, todos os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.), e o nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Peso Corporal

O gráfico presente na figura 10 mostra o peso corporal dos animais em dois diferentes estágios, o início e fim do experimento. As médias \pm EPM do peso corporal, no estágio inicial, nos quatro grupos experimentais ($315,2 \pm 7,6$ g no grupo ContVei, N=5; $331,3 \pm 14,0$ g no grupo ContCar, N=4; $329,5 \pm 9,1$ g no grupo DMVei, N=4; e $321,4 \pm 3,4$ g no grupo DMCar, N=5) foram estatisticamente equivalentes ($P > 0,05$). Porém, ao final do experimento, percebe-se que houve aumento significativo de peso corporal ($P < 0,05$) apenas nos grupos controles.

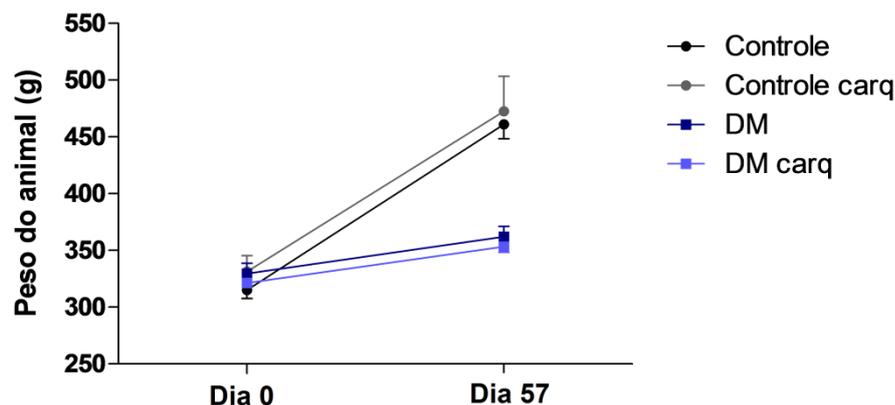


Figura 10: Peso corpóreo.

Peso corporal (média \pm E.P.M) dos animais, nos quatro grupos experimentais, ao início (dia 0) e término (dia 57) do experimento. ContVei: grupo controle que recebeu apenas veículo; ContCar: grupo controle tratado com óleo essencial de carqueja por 3 semanas; DMVei: grupo diabético que recebeu apenas veículo; DMCar: grupo diabético tratado com óleo essencial de carqueja por 3 semanas.

4.2 Peso dos corações

De acordo com os resultados demonstrados na tabela 1, as médias \pm EPM do peso total do coração nos quatro grupos experimentais, foram $1422,0 \pm 38,7$ mg no grupo ContVei, N=5; $1500,0 \pm 99,1$ mg no grupo ContCar, N=4; $1353,0 \pm 31,9$ mg no grupo DMVei, N=4; e $1288,0 \pm 24,9$ mg no grupo DMCar, N=5. Estatisticamente, não

houve diferença significativa entre o peso dos corações nos quatro grupos experimentais.

4.3 Comprimento da tibia

As médias \pm EPM do comprimento da tibia nos quatro grupos experimentais, foram $4,02 \pm 0,1$ cm no grupo ContVei, N=5; $4,02 \pm 0,1$ cm no grupo ContCar, N=4; $3,9 \pm 0,1$ cm no grupo DMVei, N=4; e $3,8 \pm 0,1$ cm no grupo DMCAR, N=5, como pode ser observado na tabela 1. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores médios de comprimento da tibia – demonstrando que não ocorreu diferença ou retardo de crescimento – dentre os grupos experimentais.

Tabela 1: Peso do coração e comprimento da tibia

	ContVei (N = 5 animais)	ContCar (N = 4 animais)	DMVei (N = 4 animais)	DMCar (N = 5 animais)
Peso do coração (mg)	1422,0 \pm 38,7	1500,0 \pm 99,1	1353,0 \pm 31,9	1288,0 \pm 24,9
Comprimento da tibia (cm)	4,02 \pm 0,1	4,02 \pm 0,1	3,9 \pm 0,1	3,8 \pm 0,1

Resultados expressos em média \pm E.P.M. $P > 0,05$ em relação às comparações entre os grupos experimentais. ContVei: grupo controle que recebeu apenas veículo; ContCar: grupo controle tratado com óleo essencial de carqueja por 3 semanas; DMVei: grupo diabético que recebeu apenas veículo; DMCAR: grupo diabético tratado com óleo essencial de carqueja por 3 semanas. Análise estatística realizada através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns para múltiplas comparações (nos valores de comprimento da tibia) e com o teste paramétrico One-way ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações (nos valores de peso do coração).

4.4 Índices de hipertrofia cardíaca

4.4.1 Razão peso do coração / peso corporal

Os grupos DMVei ($3,7 \pm 0,1$ mg/g) e DMCAR ($3,7 \pm 0,1$ mg/g) apresentaram aumento na relação HW/BW quando comparados ao ContVei ($3,1 \pm 0,1$ mg/g) ($P < 0,001$) e ao ContCar ($3,2 \pm 0,1$ mg/g) ($P < 0,01$), sugerindo que os ratos diabéticos apresentam hipertrofia cardíaca quando comparados aos controles, e que o

tratamento crônico durante 3 semanas com carqueja não reverte, porém não agrava essa alteração. Estes resultados estão evidenciados na figura 11.

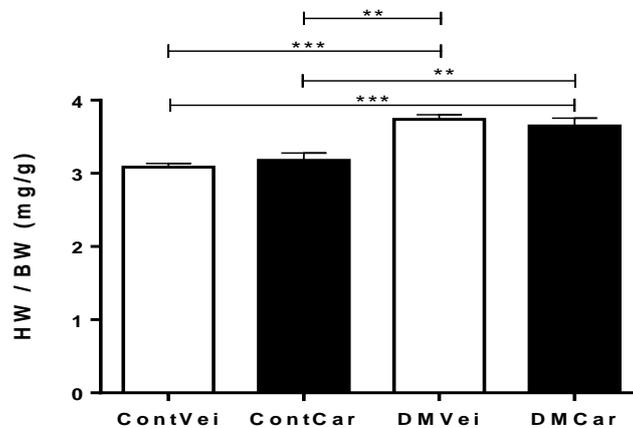


Figura 11: Razão indicativa de hipertrofia cardíaca: HW/BW.

Razão entre o peso do coração (mg) e o peso corporal (g), para os grupos ContVei (N = 5 animais), ContCar (N = 4 animais), DMVei (N = 4 animais) e DMCAR (N = 5 animais). **P < 0,01; ***P < 0,001. Análise estatística realizada através do teste paramétrico One-Way ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações.

4.4.2 Razão peso do coração / comprimento da tíbia

Conforme pode ser visto na figura 12, a relação HW/TL nos quatro grupos experimentais ($353,9 \pm 10,9$ mg/cm no grupo ContVei, N=5; $372,3 \pm 21,5$ mg/cm no grupo ContCar, N=4; $349,7 \pm 12,1$ mg/cm no grupo DMVei, N=4; e $336,0 \pm 10,8$ mg/cm no grupo DMCAR, N=5) foram estatisticamente equivalentes (P > 0,05).

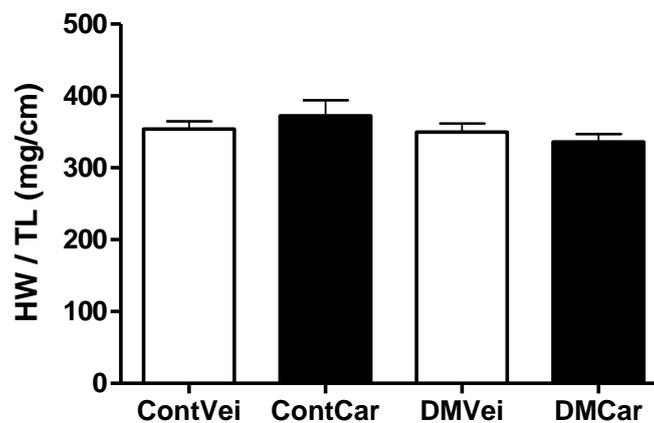


Figura 12: Razão indicativa de hipertrofia cardíaca: HW/TL.

Razão entre o peso do coração (mg) e o comprimento da tíbia (cm), para os grupos ContVei (N = 5 animais), ContCar (N = 4 animais), DMVei (N = 4 animais) e DMCAR (N = 5 animais). P > 0,05. Análise estatística realizada através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns para múltiplas comparações.

4.5 Análise eletrocardiográfica

4.5.1 Parâmetros eletrocardiográficos

Traçados representativos dos registros eletrocardiográficos obtidos nos quatro grupos experimentais podem ser observados na figura 13.

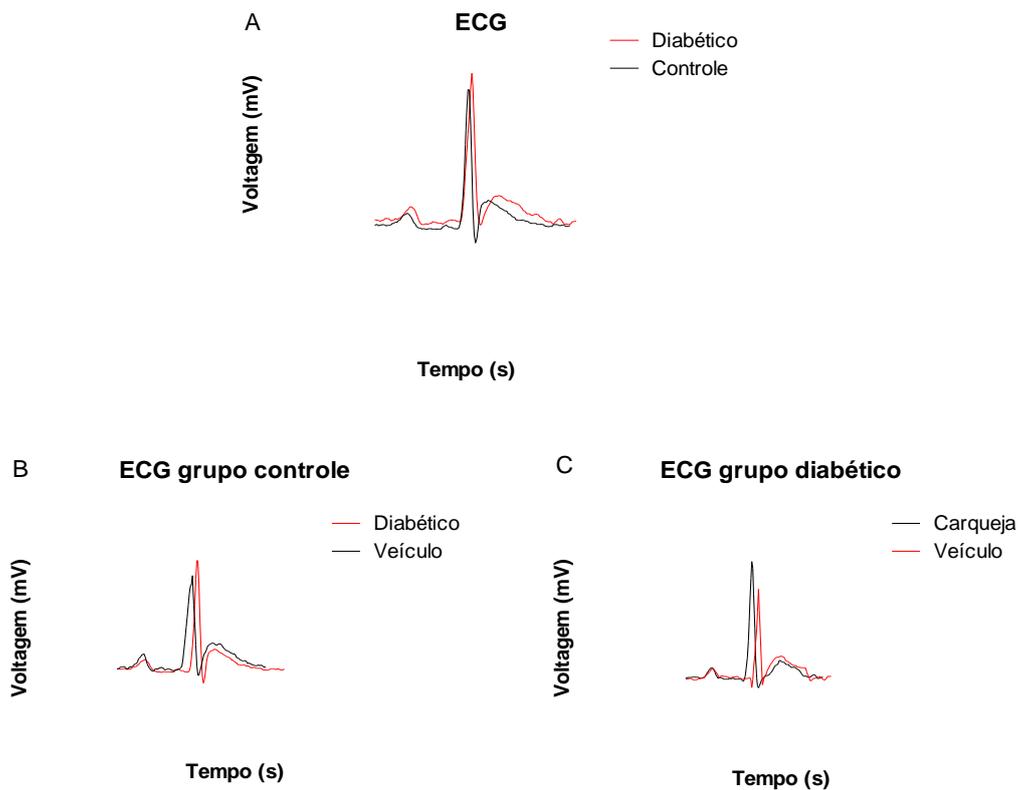


Figura 13: Traçados representativos do eletrocardiograma.

Registros eletrocardiográficos representativos da comparação entre grupo controle e diabético tratados com veículo (A), e grupo controle (B) e diabético (C) tratados com veículo e carqueja.

De acordo com a tabela 2, pode-se observar que não houve diferença estatística entre os grupos experimentais nos índices: duração da onda P, amplitude da onda P e onda T, intervalo PR e complexo QRS.

Tabela 2: Parâmetros eletrocardiográficos

	ContVei (N = 5 animais)	ContCar (N = 4 animais)	DMVei (N = 4 animais)	DMCar (N = 5 animais)
Duração da onda P (ms)	17,5 ± 1,3	23,3 ± 3,3	18,3 ± 1,1	20,4 ± 1,3
Amplitude da onda P (µV)	174,8 ± 29,1	223,6 ± 11,2	242,7 ± 16,0	144,6 ± 47,4
Amplitude da onda T (µV)	383,2 ± 70,5	325,5 ± 53,9	513,0 ± 44,5	475,2 ± 63,2
Duração do Intervalo PR (ms)	47,4 ± 0,7	54,2 ± 2,7	48,9 ± 2,1	46,4 ± 2,1
Duração do Complexo QRS (ms)	15,2 ± 0,2	15,6 ± 0,7	16,6 ± 1,0	18,9 ± 1,8

Resultados expressos em média ± E.P.M. $P > 0,05$ em relação às comparações entre os grupos experimentais. Análise estatística realizada através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns para múltiplas comparações (no índice duração do complexo QRS), e através do teste paramétrico One-Way ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações (nos demais índices).

A média da duração do intervalo QT foi $65,2 \pm 1,5$ ms no grupo ContCar, significativamente maior ($P < 0,01$) do que $57,8 \pm 1,6$ ms registrada no ContVei. Nos grupos DMVei e DMCar a média do intervalo QT foi $72,8 \pm 1,2$ ms e $75,4 \pm 1,2$ ms, respectivamente, maiores ($P < 0,0001$) do que a observada no grupo ContVei. Observa-se também que o intervalo QT é mais longo nos grupos DMVei ($P < 0,01$) e DMCar ($P < 0,001$) quando comparados ao ContCar (Figura 14A).

A média do intervalo QTc (figura 14B) foi significativamente maior ($P < 0,01$) nos grupos DMveii ($162,9 \pm 4,6$ ms) e DMCar ($162,2 \pm 3,4$ ms) quando comparados ao grupo ContVei ($139,5 \pm 4,3$ ms). O QTc também foi significativamente maior ($P < 0,01$) no grupo ContCar quando comparado ao ContVei.

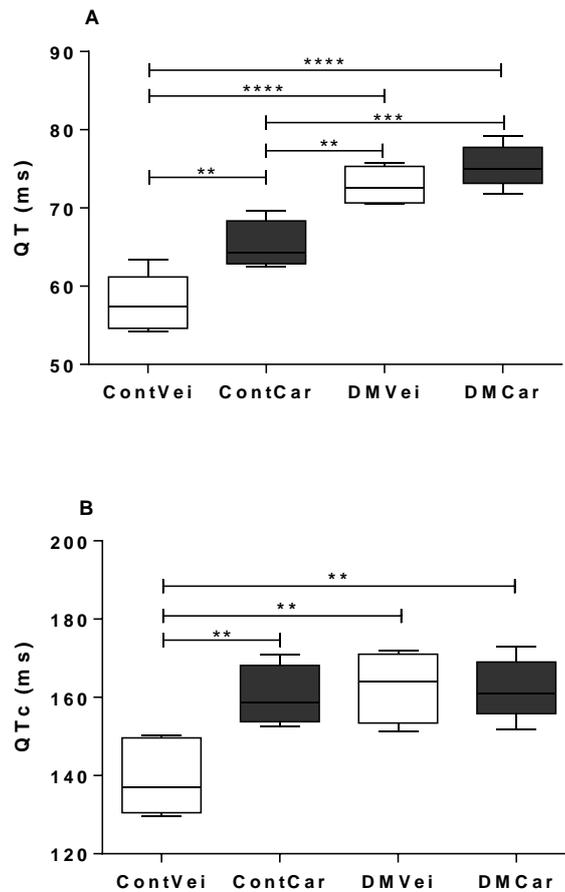


Figura 14: Duração do intervalo QT e do intervalo QT corrigido (QTc).

Em A, comparação da duração do intervalo QT, em milissegundos, entre os grupos ContVei (N = 5 animais), ContCar (N = 4 animais), DMVei (N = 4 animais) e DMCAR (N = 5 animais). Em B, comparação dos valores de duração do intervalo QTc, também em milissegundos, corrigido pela frequência cardíaca, através da fórmula de Bazett: $QTc = QT / \sqrt{RR}$, para todos os quatro grupos experimentais. Resultados expressos em média \pm E.P.M. **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001. Análise estatística realizada através do teste paramétrico *One-Way ANOVA* com pós-teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações.

Foi analisado também outro índice relacionado à repolarização ventricular, o intervalo entre o pico e o final da onda T, abreviado como Tp-e, derivado do inglês *Tpeak-Tend* (figura 15). Os valores médios para o intervalo Tp-e, dentre os quatro grupos estudados, foram respectivamente: $30,3 \pm 3,1$ ms para o grupo ContVei; $36,4 \pm 2,1$ ms para o ContCar; $37,8 \pm 0,6$ para o grupo DMVei; e $39,3 \pm 1,2$ ms para DMCAR. Havendo diferença (P < 0,05) entre os grupos ContVei e DMCAR.

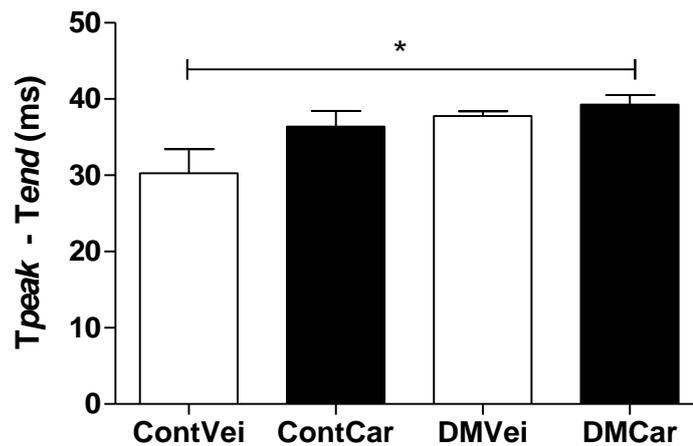


Figura 15: Duração do Intervalo T_{peak}-T_{end}.

Comparação entre os valores médios, em milissegundos, de duração do intervalo entre o pico e o final da onda T, para os quatro grupos experimentais: ContVei (N = 5 animais), ContCar (N = 4 animais), DMVei (N = 4 animais) e DMCAR (N = 5 animais). *P < 0,05. Análise estatística realizada através do teste paramétrico *One-Way* ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações.

Outro parâmetro avaliado foi a frequência cardíaca, evidenciado pela figura 16, na qual observa-se que há redução (P < 0,05) da FC no grupo DMCAR (277,7 ± 11,4 bpm) e DMVei (299,6 ± 9,6 bpm) comparado aos grupos ContCar (362,1 ± 9,8 bpm) e ContVei (365,1 ± 17,8 bpm). Ao passo que no grupo DMVei (299,6 ± 9,7 bpm) não se observa diferença estatística em relação ao grupo DMCAR assim como na comparação entre os grupos ContVei e ContCar.

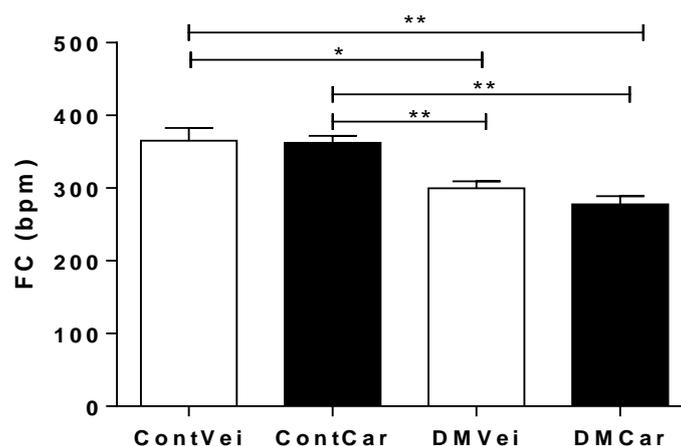


Figura 16: Frequência Cardíaca.

Comparação entre as médias, em batimentos por minuto (bpm), da frequência cardíaca para os quatro grupos estudados: ContVei (N = 5 animais), ContCar (N = 4 animais), DMVei (N = 4 animais) e DMCAR (N = 5 animais). *P < 0,05; **P < 0,01. Análise estatística realizada através do teste paramétrico *One-Way* ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações.

4.5.2 Variabilidade da frequência cardíaca

4.5.2.1 Índices no domínio do tempo

Dentre os índices no domínio do tempo, apresenta-se inicialmente, a média e mediana dos intervalos RR normais, conforme pode ser visto na figura 17. Os valores de média dentre os quatro grupos estudados foram respectivamente, $179,7 \pm 9,2$ ms no grupo ContVei, $176,6 \pm 4,1$ ms para ContCar, $193,2 \pm 3,8$ ms para o grupo DMVei, e $215,9 \pm 10,2$ ms para DMCar. Ao passo que os valores de mediana foram de $180,2 \pm 9,2$ ms para o ContVei, $176,7 \pm 3,9$ ms para ContCar, $193,5 \pm 3,8$ ms para DMVei, e $215,2 \pm 9,9$ ms para DMCar. Observa-se que há aumento ($P < 0,05$) nos valores de média e mediana dos intervalos RR nos ratos diabéticos tratados com carqueja quando comparados aos controles que receberam veículo.

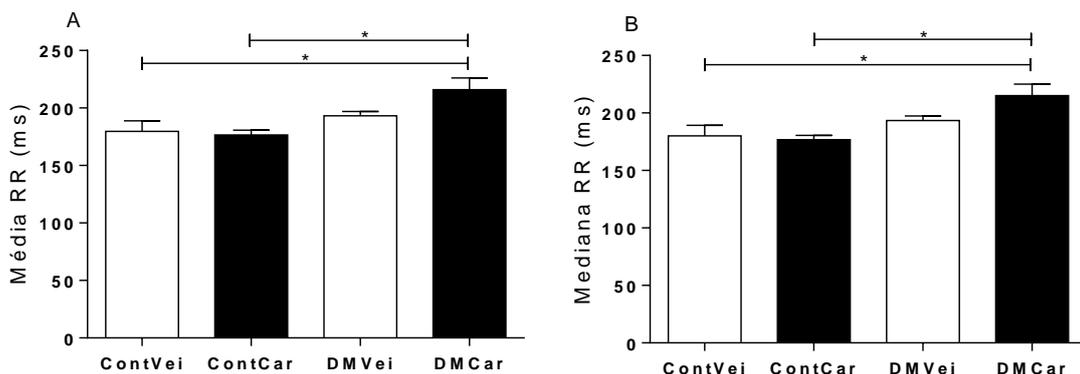


Figura 17: Média e Mediana dos Intervalos RR

Comparação da média (A) e mediana (B) da duração de intervalos RR normais, em milissegundos, dentro os grupos ContVei (N = 5 animais), ContCar (N = 4 animais), DMVei (N = 4 animais) e DMCar (N = 5 animais). Resultados expressos em média \pm E.P.M. * $P < 0,05$. Análise estatística realizada através do teste paramétrico *One-Way ANOVA* com pós-teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações.

Os demais índices do domínio do tempo da VFC, não apresentaram diferença significativa quando comparados entre os quatro grupos experimentais, conforme pode ser visto nos resultados do pNN5, SDNN e rMSSD, apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros da VFC no domínio do tempo e da frequência

	ContVei (N = 5 animais)	ContCar (N = 4 animais)	DMVei (N = 4 animais)	DMCar (N = 5 animais)
DOMÍNIO DO TEMPO				
pNN5 (%)	7,5 ± 4,1	26,4 ± 8,7	23,8 ± 11,8	28,2 ± 13,3
SDNN (ms ²)	5,2 ± 0,8	6,3 ± 1,5	4,2 ± 0,5	7,2 ± 2,5
rMSSD (ms)	4,1 ± 0,6	4,8 ± 1,1	3,9 ± 0,9	7,8 ± 4,3
DOMÍNIO DA FREQUÊNCIA				
VLF (ms)	13,3 ± 3,8	24,2 ± 12,4	8,0 ± 2,1	13,1 ± 3,8
LF (nu)	28,1 ± 6,6	32,6 ± 5,8	53,3 ± 5,5	35,4 ± 6,2
HF (nu)	67,3 ± 7,7	62,3 ± 5,5	43,7 ± 5,1	64,1 ± 6,1
Razão LF/HF*	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,4 ± 0,4	0,6 ± 0,1

Resultados expressos em média ± E.P.M. $P > 0,05$ (*exceto para a razão LF/HF) em relação às comparações entre os grupos experimentais. Análise estatística realizada através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns para múltiplas comparações (nos índices SDNN, rMSSD, LF) e através do teste paramétrico *One-Way* ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações (nos índices pNN5, VLF, HF e LF/HF).

4.5.2.2 Índices no domínio da frequência

Os valores dos índices da VFC no domínio da frequência podem ser observados na tabela 3. Os componentes de muito baixa frequência (LF) e de alta frequência (HF) não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais (figura 18). No entanto, há aumento significativo ($P < 0,05$) do índice simpatovagal (LF/HF) no grupo DMVei quando comparado aos outros grupos experimentais (Figura 18C). Além disso, o tratamento com carqueja no grupo diabético (DMCar) reduziu ($P < 0,05$) o índice simpatovagal, equiparando-o ao dos controles (ContVei e ContCar), parecendo reverter o desbalanço autonômico que é apresentado pelo grupo DMVei.

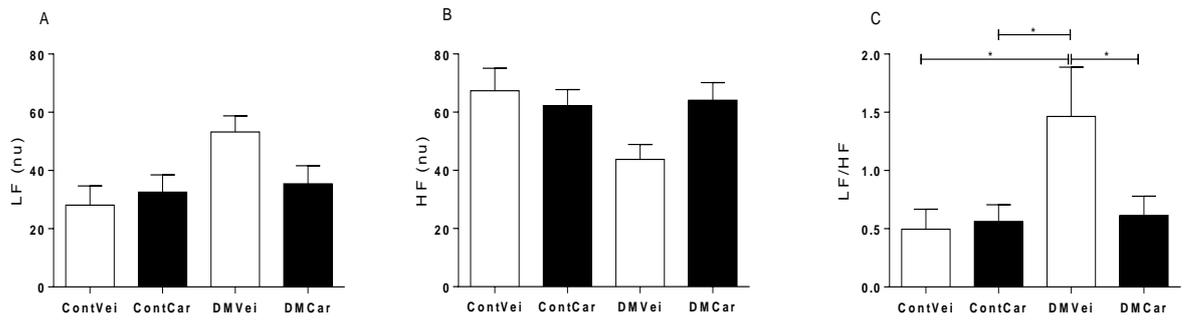


Figura 18: Parâmetros da VFC no domínio da frequência.

Em A, o componente de baixa frequência (*Low Frequency*). Em B, o componente de alta frequência (*High Frequency*), ambos em unidades normalizadas. Em C, a razão LF/HF, representando o índice simpátovagal. * $P < 0,05$. Análise estatística realizada através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns para múltiplas comparações (no índice LF) e através do teste paramétrico *One-Way ANOVA* com pós-teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações (nos índices HF e LF/HF).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou, *in vivo*, os efeitos do tratamento crônico por 3 semanas com óleo essencial de carqueja sobre a eletrofisiologia cardíaca e balanço autonômico de ratos diabéticos. A indução do DM2 nos ratos *Wistar* foi realizada através da associação entre a dieta de cafeteria, que durou três semanas, seguido de injeção única de estreptozotocina, na dose 35mg/kg via intraperitoneal. Esta combinação é recomendada pela literatura (Reed *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008; Skovsø, 2014; Qian *et al.*, 2015) visto que a DCAF, por ser hiperlipídica e hiperglicídica, induz obesidade, resistência à insulina, hiperglicemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, além de hiperinsulinemia compensatória (Srinivasan *et al.*, 2005). Seus efeitos são condicionados ao período de tempo em que ocorre o consumo da dieta, que pode ser classificado como relativamente longo (acima de três meses) ou relativamente curto (entre 2 a 4 semanas) (Skovsø, 2014).

A administração de altas doses de STZ causa um dano crítico às células beta-pancreáticas, promovendo o desenvolvimento, *in vivo*, de um modelo semelhante ao DM1. Ao passo que, a administração de baixas doses de STZ (que foi o modelo escolhido em nosso estudo) após o tratamento com a DCAF é capaz de causar disfunção nas células beta, promovendo um comprometimento gradual na secreção de insulina, equiparando-se à evolução do DM2 em humanos. Dessa forma, o protocolo que associa ambos os recursos, como supracitado, induz aumento dos níveis glicêmicos e redução da secreção de insulina, alterações características e confirmatórias do DM2 (Qian *et al.*, 2015).

A composição da dieta de cafeteria utilizada na presente pesquisa está intimamente associada ao padrão de consumo humano na cultura ocidental, e sua composição varia consideravelmente na literatura (Prats *et al.*, 1989), podendo esta possuir, por exemplo, 20% de lipídeos, 45% de carboidratos e 22% de proteínas (Qian *et al.*, 2015), 41,28% de carboidratos, 15,43% de proteínas e 43,29% de lipídeos (Almeida *et al.*, 2015) ou ainda 45-53% de lipídeos, aproximadamente 20% de proteínas e 35% de carboidratos (Johnson *et al.*, 2016).

Em contraposição, a dieta padrão destinada aos animais dos grupos controles, de acordo com a literatura, é classificada como sendo composta por 5% de lipídeos, 52% de carboidratos e 20% proteínas (Qian *et al.*, 2015), se assemelhando à ração

Nuvilab®, utilizada em nosso estudo. Essa diferença ressalta o caráter hiperglicídico e, principalmente, hiperlipídico da DCAF, que são os principais determinantes do aumento da quantidade de quilocalorias fornecidas por grama (kcal/g) dessa dieta, visto que, a DCAF possui 4.186 kcal/g enquanto a dieta padrão tem sua quantidade de energia praticamente reduzida à metade, isto é, 2.93 kcal/g (Macedo *et al.*, 2012).

Com relação à indução de obesidade, apesar de não haver uma padronização que defina essa alteração em roedores, esta parece estar atrelada ao maior tempo de administração da dieta de cafeteria (Skovsø, 2014), justificando o não desenvolvimento de obesidade nos animais dos grupos DMVei e DMCar, visto que esses foram submetidos ao consumo dessa ração apenas durante 3 semanas. No entanto, já foi relatado que um período relativamente curto de consumo da DCAF, como utilizado no presente estudo, demonstrou-se suficiente para induzir o desenvolvimento de resistência à insulina (Srinivasan *et al.*, 2005; Skovsø, 2014; Qian *et al.*, 2015).

O não desenvolvimento de obesidade nos ratos diabéticos poderia justificar o não ganho de peso corporal nesses animais quando comparados aos controles. Outro fator capaz de influenciar nesse resultado é o próprio mecanismo fisiopatológico do DM2 que, devido à resistência à insulina e desbalanço glicêmico, gera recorrente ativação da gliconeogênese, induzindo beta-oxidação dos ácidos graxos (Haber *et al.*, 2001) e catabolismo proteico (Chevalier *et al.*, 2006), favorecendo a perda de massa corporal, principalmente muscular, conforme o avanço da doença (Park *et al.*, 2009).

Uma das complicações crônicas do DM2 é a Neuropatia Autonômica Cardiovascular, que está associada à hipertrofia ventricular esquerda e à disfunção diastólica (Tannuse, 2015). Tais alterações são comumente observadas em modelos experimentais, *in vivo*, de DM2 para estudo da cardiomiopatia diabética (Okoshi *et al.*, 2007). A razão entre o peso do coração e o peso corporal, denominada em inglês como *Heart Weight/Body Weight* (HW/BW), é amplamente utilizada como indicativo de hipertrofia cardíaca em modelos animais (Joseph, 1908; Desrois *et al.*, 2004; Yang e Peng, 2010; Radovits *et al.*, 2015) e inclusive, *post mortem*, em humanos (Cunha *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, a relação HW/BW se demonstrou aumentada nos grupos DMVei e DMCar, sugerindo que o próprio diabetes *mellitus* tipo 2 induz a hipertrofia

cardíaca, corroborando o já relatado na literatura (Radovits *et al.*, 2015), e que o tratamento com óleo essencial de carqueja não reverte, porém não agrava esta alteração.

Apesar do índice HW/BW ser bem aceito pela literatura como marcador de hipertrofia cardíaca, as variações no peso do animal podem influenciar nesse resultado, por isso, como forma de eliminar essas possíveis variações, utiliza-se também outra razão, a HW/TL (Yin *et al.*, 1982). Em nosso estudo, não houve diferença estatística nos quatro grupos experimentais (ContVei, ContCar, DMVei e DMCar) com relação ao índice HW/TL, não se confirmando a alteração demonstrada pelo índice HW/BW nos grupos DMVei e DMCar. Isso sugere que a alteração demonstrada anteriormente pode ter ocorrido em função da diferença do peso corporal observada entre ratos diabéticos quando comparado aos controles.

Portanto, faz-se necessário investigar se a hipertrofia cardíaca nos grupos diabéticos (demonstrada pelo resultado significativo na razão HW/BW) é realmente fidedigna. Para isso, devem-se utilizar métodos com maior sensibilidade, especificidade e acurácia (Costa *et al.*, 2009) como, por exemplo, o ecocardiograma e o eletrocardiograma (Povoa e Souza, 2008). Além destes, também podem ser utilizadas a radiografia de tórax e a ressonância magnética nuclear para detecção da HVE (Costa *et al.*, 2009). O ecocardiograma seria o exame mais indicado para investigar alterações em estrutura e funcionamento cardíaco de portadores do DM2 (Okoshi *et al.*, 2007), porém, não foi possível realizar essa técnica experimental devido a dificuldades metodológicas (Povoa e Souza, 2008).

Em contrapartida, foi possível realizar o eletrocardiograma, técnica amplamente empregada na prática clínica devido a sua disponibilidade, interpretação relativamente fácil, baixo custo e boa reprodutibilidade (Povoa e Souza, 2008), e utilizada tanto para diagnóstico quanto prognóstico, posto que mediante visualizações de alterações eletrocardiográficas compatíveis com HVE, é possível prever o aumento do risco cardiovascular do indivíduo ou animal analisado de forma não invasiva (Costa *et al.*, 2009). Ademais, o ECG é classificado como sendo o padrão ouro para diagnóstico de arritmias e distúrbios de condução (Nicolau *et al.*, 2003).

A realização dessa técnica foi feita na derivação DII, uma derivação periférica e bipolar, ou seja, capaz de registrar a diferença de potencial entre duas

extremidades, que são o polo positivo situado no membro inferior esquerdo e o polo negativo situado no membro superior direito. Essa derivação permite a visualização e avaliação de ondas, segmentos, intervalos e complexos (Neto, 1948), dentre as quais estão a duração e amplitude da onda P, o intervalo PR, o complexo QRS, intervalo QT e QTc, a amplitude da onda T, intervalo Tp-e e frequência cardíaca.

A onda P (primeira onda dos traçados eletrocardiográficos normais) representa a despolarização atrial, e pode possuir alterações em sua amplitude e/ou duração em decorrência da Neuropatia Autonômica Diabética, predispondo a ocorrência de fibrilação atrial paroxística, devido aos distúrbios de condução do estímulo intra e interatrial (Bissinger *et al.*, 2011). O intervalo PR, que conecta a onda P ao complexo QRS, pode estar alterado em função de bloqueio atrioventricular de primeiro grau ou na síndrome de pré-excitação ventricular (Feldman e Goldwasser, 2004). Apesar das alterações já descritas, não foi observado diferença significativa, em nosso estudo, nesses índices entre os quatro grupos experimentais.

Em sequência ao intervalo PR, se estabelece o complexo QRS, relacionado à despolarização ou ativação ventricular (Feldman e Goldwasser, 2004). Anormalidades em sua duração ou amplitude estão relacionadas a várias alterações cardiovasculares, como a hipertensão, a hipertrofia ventricular esquerda, fibrose, doença arterial coronariana e cardiomiopatia dilatada (Lund *et al.*, 2013), alterações que podem estar presentes, inclusive, na cardiomiopatia diabética (Okoshi *et al.*, 2007). Porém, novamente, não foram observadas mudanças nesse índice em nosso estudo.

Logo após o complexo QRS, inicia-se o processo de repolarização ventricular, representado pela onda T (Feldman e Goldwasser, 2004). Com relação a sua amplitude, também não houve diferença estatística entre os grupos ContVei, ContCar, DMVei e DMCar. De acordo com a literatura, ela pode estar alterada em função de distúrbios da própria repolarização, isquemia miocárdica, hiperpotassemia (Feldman e Goldwasser, 2004) ou hipocalcemia (Nicolau *et al.*, 2003).

A duração da onda T e o segmento ST (que compreende o fim do complexo QRS e o início da onda T) não puderam ser determinados em nosso estudo. Isso ocorre em virtude das características próprias do traçado eletrocardiográfico *in vivo*, quando este é comparado ao registro obtido em humanos. Dentre as modificações apresentadas pelos ratos, lista-se a menor duração dos potenciais de ação (com

ausência da fase de *plateau*) dos cardiomiócitos ventriculares, e a redução da capacidade contrátil cardíaca, resultando em uma frequência cardíaca elevada (em torno de 300 a 500 batimentos por minuto) (Farraj *et al.*, 2011).

Com isso, como a repolarização ocorre de forma seguida e imediata à despolarização, não há formação da onda Q nem do segmento ST, tampouco há uma percepção clara entre o ponto exato em que ocorre o término do complexo QRS e o início da onda T, fazendo com que a delimitação da duração da onda T seja prejudicada. Dessa forma, o índice QT, QTc e Tp-e são usualmente preferidos para avaliar o processo de repolarização ventricular em ratos e camundongos (Farraj *et al.*, 2011).

O intervalo QT, fidedigno para avaliar a repolarização ventricular (Konopelski e Ufnal, 2016), compreende todo o tempo entre o início do complexo QRS e o final da onda T, estando diretamente correlacionado ao tempo em que o estímulo elétrico permanece nos ventrículos (Feldman e Goldwasser, 2004). O QT pode estar aumentado em distúrbios eletrolíticos, como hipocalcemia, hipocalemia e hipomagnesemia, e em diversas doenças, como no hipotireoidismo, cardiomiopatias, obesidade e hipertensão (Isbister e Page, 2013), na síndrome do QT longo (Schwartz *et al.*, 2012) e, inclusive, no diabetes *mellitus* tipo 2 (Jermendy *et al.*, 1990).

A identificação do aumento desse intervalo é uma forma não invasiva de prever o risco de mortalidade cardiovascular (Kittnar, 2015), posto que, o prolongamento do QT aumenta o risco de morte súbita (Yap e Camm, 2003), aumenta o risco de arritmogênese (Clemente *et al.*, 2012), e é o maior fator de risco para o desenvolvimento de Torsades de Pointes (Isbister e Page, 2013) uma arritmia maligna caracterizada por taquicardia com QRS longo e alta letalidade (Nicolau *et al.*, 2003).

Em nosso estudo, observamos aumento do intervalo QT nos animais dos grupos DMVei, alteração desencadeada pelo próprio diabetes *mellitus* tipo 2 como já descrito na literatura (Jermendy *et al.*, 1990). Também foi observado aumento semelhante desse intervalo no grupo DMCar, sugerindo que o tratamento com óleo essencial de carqueja não reverte e não agrava as alterações já pré-existentes nos animais diabéticos. Ambos esses grupos (DMVei e DMCar) apresentaram um intervalo QT maior do que os grupos controles (ContVei e ContCar), o que também

era esperado. No entanto, houve diferença estatística entre os grupos ContCar e ContVei, com aumento no intervalo QT no grupo controle que recebeu óleo essencial de carqueja, sugerindo que esse tratamento pode influenciar na propagação do estímulo elétrico durante a despolarização e repolarização ventricular, induzindo a geração de focos ectópicos de arritmia.

Como o intervalo QT varia de acordo com a frequência cardíaca, de forma inversamente proporcional (Kittnar, 2015), é possível corrigi-lo através das fórmulas de Bazett, Fridericia, Hodges e Sagie (Roboz *et al.*, 2014). Em nosso estudo, a correção foi realizada através da fórmula de Bazett ($QTc = QT/\sqrt{RR}$), utilizada rotineiramente na prática clínica e que consiste na divisão do valor do intervalo QT pela raiz quadrada do intervalo RR, gerando um valor de QT ajustado pela FC (Clemente *et al.*, 2012). Resultado semelhante ao QT foi observado com o intervalo QTc, onde o grupo ContCar apresentou maior duração desse intervalo quando comparado ao ContVei, de forma a se equiparar aos grupos DMVei e DMCAR.

O aumento do intervalo QTc está relacionado à disfunção autonômica, à geração de arritmias, principalmente taquicardia ventricular e fibrilação ventricular (Kittnar, 2015), à hipertrofia ventricular esquerda (Haugaa *et al.*, 2014), à hipoglicemia severa (Miki *et al.*, 2014) à hiperglicemia e ao aumento da mortalidade (Pickham *et al.*, 2014). Dessa forma, o aumento desse índice nos animais do grupo controle tratado (ContCar) sugere que o óleo essencial de carqueja pode atuar como um agente arritmogênico e indutor do aumento do risco de morte súbita. No entanto, em virtude deste ser um projeto piloto, inovador e com um número amostral reduzido, ainda são necessários mais estudos para averiguar sua segurança sobre o sistema cardiovascular de animais diabéticos e não diabéticos. Além de ser fundamental investigar tais efeitos, *in vivo*, com um maior tempo de tratamento e com doses em múltiplas concentrações, posto que, no presente estudo, o tempo de tratamento durou apenas três semanas e foi realizado com uma dose fixa de 20mg/kg/dia.

Outro índice analisado neste estudo foi o intervalo entre o pico e o final da onda T (Tp-e), que está intimamente associado à dispersão transmural da repolarização do ventrículo esquerdo (Clemente *et al.*, 2012). O Tp-e é um marcador independente para o aumento do risco de morte súbita e da ocorrência de arritmias ventriculares por reentrada (Panikkath *et al.*, 2011), tanto em pacientes de alto risco quanto na

população em geral, mesmo quando não há alteração no intervalo QT (Miki *et al.*, 2014) ou quando este não pode ser mensurado devido, por exemplo, ao prolongamento da duração do complexo QRS (Panikkath *et al.*, 2011).

Foi observado, no presente estudo, aumento do intervalo Tp-e nos animais do grupo DMCar quando comparados ao do grupo ContVei, sugerindo que esse aumento ocorre, também, como consequência do próprio diabetes *mellitus* tipo 2, ocorrência já descrita na literatura (Tokatli *et al.*, 2016). Esta alteração não foi revertida mesmo com o controle glicêmico (Miki *et al.*, 2014). Sendo assim, os resultados deste trabalho sugerem que o tratamento com carqueja não é um agente agravante da dispersão transmural da repolarização desencadeada pelo DM2.

Também foi avaliada, em nosso estudo, a frequência cardíaca dos animais nos quatro grupos experimentais. Ela é determinada pelo intervalo RR, isto é, entre ondas R consecutivas (Wallot *et al.*, 2013), e é imprescindível para a mensuração dos índices da Variabilidade da Frequência Cardíaca (Vanderlei *et al.*, 2012). É possível haver redução ou aumento da frequência cardíaca em repouso nos pacientes com DM2, e isso se deve a existência ou não de comprometimento do SNA (Ewing *et al.*, 1981). Em nossos resultados, os grupos DMVei e DMCar realmente possuíram menor FC quando comparados aos controles, resultado semelhante ao apresentado na literatura (Jacobson *et al.*, 2007).

De forma similar, os resultados da média e mediana dos intervalos RR, que são os primeiros resultados da VFC, corroboram o achado anterior de redução da FC nos grupos diabéticos, já que, em nosso estudo, os animais do grupo DMCar apresentaram aumento da duração dos intervalos RR normais quando comparado aos controles. Com relação aos parâmetros no domínio do tempo da VFC, tem-se que o SDNN representa o tônus simpático e vagal, enquanto o pNN5 e rMSSD estão relacionados à atividade parassimpática (Vanderlei *et al.*, 2009), no entanto, em nosso estudo, não foi observado diferença estatística nesses parâmetros dentre os quatro grupos experimentais analisados.

Já no domínio da frequência, apresentam-se os índices VLF, LF, HF e LF/HF. O componente de muita baixa frequência (VLF), que pode estar relacionado à frequência respiratória, à ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e às oscilações do próprio sistema termorregulatório (Francis *et al.*, 2000). O componente de baixa frequência (LF) representa as atividades do sistema simpático

e parassimpático (Tarvainen *et al.*, 2014), porém com predomínio do simpático (Vanderlei *et al.*, 2012), ao passo que o componente de alta frequência (HF) reflete apenas a atividade do sistema parassimpático (Tarvainen *et al.*, 2014).

Apesar de existir, no grupo diabético tratado com veículo (DMVei) uma tendência à aumento do componente de baixa frequência (LF) e à redução do componente de alta frequência (HF), não houve alteração significativa desses índices em nosso estudo dentre os quatro grupos analisados. No entanto, de acordo com a literatura, o DM2 reduz os parâmetros no domínio da frequência da VFC, aumentando o risco cardiovascular dos portadores dessa doença (Stuckey e Petrella, 2013).

Todavia, observou-se em nossa pesquisa, aumento significativo do índice simpátovagal (razão LF/HF) no grupo DMVei quando comparado aos controles. Este índice representa a contrarregulação entre o sistema simpático e parassimpático que ocorre de forma homeostática, refletindo, portanto, o balanço autonômico (Vanderlei *et al.*, 2009). Resultado semelhante foi encontrado na literatura (Hari Babu e Muralikrishnan, 2016), indicando distúrbio autonômico promovido pelo próprio DM2. O tratamento com óleo essencial de carqueja, no grupo DMCar, reverteu o aumento nesse índice, equiparando o valor dessa razão ao observado nos controles, sugerindo que a carqueja é capaz de promover uma recuperação no balanço autonômico cardiovascular desencadeada pelo DM2 (De Angelis *et al.*, 2007), sugerindo seu potencial valor terapêutico.

6. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que:

- Ratos diabéticos desenvolvem distúrbios de repolarização ventricular e desbalanço autonômico;
- O óleo essencial de carqueja não reverte as alterações na repolarização ventricular observadas nos ratos diabéticos;
- A administração crônica de óleo essencial de carqueja reverte o desbalanço autonômico observado nos ratos diabéticos;
- O óleo essencial prolongou a repolarização ventricular de ratos não-diabéticos;
- Será necessário realizar mais estudos para averiguar a segurança e eficácia dessa planta medicinal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMONEIM, A. S. et al. Risk of acute coronary events associated with glyburide compared with gliclazide use in patients with type 2 diabetes: a nested case-control study. **Diabetes Obes Metab**, v. 16, n. 1, p. 22-9, Jan 2014. ISSN 1463-1326. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23802997> >.

ACHUTTI, A. Prevenção de doenças cardiovasculares e promoção da saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, p. 18-20, 2012. ISSN 1413-8123.

ADA. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 33, n. Suppl 1, p. S62-S69, //revised 2010. ISSN 0149-5992/1935-5548. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2797383/> >.

ADA, A. D. A. **Standards of Medical Care in Diabetes**. *Diabetes Care*. 39: S1-S112 p. 2016.

ALMEIDA, M. E. F. et al. **Dieta de cafeteria com chocolate, amendoim e biscoito: eficácia na indução do excesso de peso e da dislipidemia em ratos.** Cafeteria diet with chocolate, peanut and cookie: effectiveness in induction of overweight and dyslipidemia in rats. SIMÃO, A. A. SaBios: Revista Saúde e Biologia: Faculdade Integrado de Campo Mourão. 10: 15 - 24 p. 2015.

ARAÚJO, L. M. B.; BRITTO, M. M. D. S.; PORTO DA CRUZ, T. R. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, p. 509-518, 2000. ISSN 0004-2730.

BAIN, S. et al. Cardiovascular events and all-cause mortality associated with sulphonylureas compared with other antihyperglycaemic drugs: A Bayesian meta-analysis of survival data. **Diabetes Obes Metab**, v. 19, n. 3, p. 329-335, Mar 2017. ISSN 1463-1326. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27862902> >.

BALDONI, A. D. O. et al. **Secretagogos de Insulina: Riscos Cardiovasculares e Hipoglicêmicos.** Insulin Secretagogues: Cardiovascular and Hypoglycemic Risk. GUILARDUCCI, N. V. 11: 1-5 p. 2014.

BANSAL, V.; KALITA, J.; MISRA, U. K. Diabetic neuropathy. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, n. 964, p. 95-100, 2006. ISSN 0032-5473/1469-0756. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2596705/> >.

BELL, D. S. Do sulfonylurea drugs increase the risk of cardiac events? **CMAJ**, v. 174, n. 2, p. 185-6, Jan 2006. ISSN 1488-2329. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16415463> >.

BENJAMIN, E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, 2017. Disponível em: < <http://circ.ahajournals.org/content/early/2017/01/25/CIR.0000000000000485.abstract> >.

BISSINGER, A. et al. The effect of diabetic autonomic neuropathy on P-wave duration, dispersion and atrial fibrillation. **Archives of Medical Science : AMS**, v. 7, n. 5, p. 806-812, 2011. ISSN 1734-1922/1896-9151. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3258812/> >.

BOER, C. A. D. A.; MOCELIN, A. J.; MATSUO, T. Validação dos testes de Ewing para avaliação de disfunção autonômica. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 56, p. 250-254, 1998. ISSN 0004-282X.

CALSOLARI, M. R. et al. Diabetes auto-imune latente do adulto ou diabetes melito tipo 2 magro? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, p. 315-321, 2008. ISSN 0004-2730.

CAMPOS, F. V. D. S. **Efeitos da Eletro-estimulação transcutânea ganglionar no sistema cardiovascular em cardiopatas**. Universidade de Brasília - Faculdade de Ceilândia. Programa de pós graduação stricto-sensu em ciências e tecnologias em saúde 2014.

CARDOSO, A. P. Z. et al. Aspectos clínicos e socioeconômicos das dislipidemias em portadores de doenças cardiovasculares. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 21, p. 417-436, 2011. ISSN 0103-7331.

CAROLINO, I. D. R. et al. Risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 16, p. 238-244, 2008. ISSN 0104-1169.

CHEN, Y. et al. Cost of gestational diabetes mellitus in the United States in 2007. **Popul Health Manag**, v. 12, n. 3, p. 165-74, Jun 2009. ISSN 1942-7905. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19534581> >.

CHEVALIER, S. et al. The Greater Contribution of Gluconeogenesis to Glucose Production in Obesity Is Related to Increased Whole-Body Protein Catabolism. **Diabetes**, v. 55, n. 3, p. 675, 2006. Disponível em: < <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/55/3/675.abstract> >.

CLEMENTE, D.; PEREIRA, T.; RIBEIRO, S. Repolarização ventricular em pacientes diabéticos: caracterização e implicações clínicas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 99, p. 1015-1022, 2012. ISSN 0066-782X.

CORTEZ, D. N. et al. Complicações e o tempo de diagnóstico do diabetes mellitus na atenção primária. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 28, p. 250-255, 2015. ISSN 0103-2100.

COSTA, F. D. A. et al. O eletrocardiograma no diagnóstico da hipertrofia ventricular de pacientes com doença renal crônica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, p. 380-386, 2009. ISSN 0066-782X.

CUNHA, D. F. D. et al. Heart Weight and Heart Weight/Body Weight Coefficient in Malnourished Adults. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 78, p. 385-387, 2002. ISSN 0066-782X.

DE ANGELIS, K.; SANTOS, M. D. S. B.; IRIGOYEN, M. C. **Sistema Nervoso Autônomo e Doença Cardiovascular**. SANTOS, M. D. S. B. Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul: 1-7 p. 2004.

DE ANGELIS, K. et al. Disfunção autonômica cardiovascular no diabetes mellitus experimental. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, p. 185-194, 2007. ISSN 0004-2730.

DE LA MONTE, S. M.; WANDS, J. R. Alzheimer's Disease Is Type 3 Diabetes—Evidence Reviewed. **Journal of diabetes science and technology (Online)**, v. 2, n. 6, p. 1101-1113, 11/ 2008. ISSN 1932-2968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2769828/> >.

DEFRONZO, R. A. From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. **Diabetes**, v. 58, n. 4, p. 773-795, 2009. ISSN 0012-1797/1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2661582/> >.

DESROIS, M. et al. Gender differences in hypertrophy, insulin resistance and ischemic injury in the aging type 2 diabetic rat heart. **J Mol Cell Cardiol**, v. 37, n. 2, p. 547-55, Aug 2004. ISSN 0022-2828 0022-2828.

DUQUE, M. et al. Neuropatía autonómica diabética cardiovascular. **Revista Colombiana de Cardiología**, v. 20, n. 2, p. 80-87, 2013/03/01/ 2013. ISSN 0120-5633. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0120563313700317> >.

D'ADAMO, E.; CAPRIO, S. Type 2 Diabetes in Youth: Epidemiology and Pathophysiology. **Diabetes Care**, v. 34, n. Supplement 2, p. S161, 2011. Disponível em: < http://care.diabetesjournals.org/content/34/Supplement_2/S161.abstract >.

EWING, D. J. et al. VASCULAR REFLEXES IN DIABETIC AUTONOMIC NEUROPATHY. **The Lancet**, v. 302, n. 7842, p. 1354-1356, 1973/12/15/ 1973. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673673933230> >.

EWING, D. J.; CAMPBELL, I. W.; CLARKE, B. F. Heart rate changes in diabetes mellitus. **Lancet**, v. 1, n. 8213, p. 183-6, Jan 24 1981. ISSN 0140-6736 (Print)0140-6736.

FARRAJ, A. K.; HAZARI, M. S.; CASCIO, W. E. The utility of the small rodent electrocardiogram in toxicology. **Toxicol Sci**, v. 121, n. 1, p. 11-30, May 2011. ISSN 1096-0929. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21278051> >.

FELDMAN, J.; GOLDWASSER, G. P. **Eletrocardiograma: recomendações para a sua interpretação.** Publicação Oficial da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro. GOLDWASSER, G. P. Revista Brasileira de Cardiologia. 17 2004.

FERREIRA, L. T. et al. **Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações.** Diabetes mellitus: hyperglycemia and its chronic complications. SAVIOLLI, I. H. Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde. 36: 182-188 p. 2011.

FOSS-FREITAS, M. C.; MARQUES JUNIOR, W.; FOSS, M. C. Neuropatia autonômica: uma complicação de alto risco no diabetes melito tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, p. 398-406, 2008. ISSN 0004-2730.

FRANCIS, D. P. et al. Very-low-frequency oscillations in heart rate and blood pressure in periodic breathing: role of the cardiovascular limb of the hypoxic chemoreflex. **Clin Sci (Lond)**, v. 99, n. 2, p. 125-32, Aug 2000. ISSN 0143-5221 (Print)0143-5221.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 178-182, 2005. ISSN 0102-695X.

FUSTER, V.; KELLY, B. B. **Meeting the Challenges in Developing Countries. Promoting Cardiovascular Health in the Developing World: A Critical Challenge to Achieve Global Health.** . Institute of Medicine (US) Committee on Preventing the Global Epidemic of Cardiovascular Disease. Epidemiology of Cardiovascular Disease. 2010

FÚSTER, V. [Science, health and education: a priority and a model]. **Arch Cardiol Mex**, v. 80, n. 4, p. 261-71, 2010 Oct-Dec 2010. ISSN 1405-9940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21169091> >.

GARRATT, K. N. et al. Sulfonylurea drugs increase early mortality in patients with diabetes mellitus after direct angioplasty for acute myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**, v. 33, n. 1, p. 119-24, Jan 1999. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9935017> >.

GUO, V. Y. et al. Retinal Information is Independently Associated with Cardiovascular Disease in Patients with Type 2 diabetes. **Sci Rep**, v. 6, p. 19053, Jan 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26754623> >.

HABER, E. P. et al. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, p. 219-227, 2001. ISSN 0004-2730.

HARI BABU, H. R.; MURALIKRISHNAN, K. **Frequency Domain Analysis of Heart Rate Variability in Type II Diabetes Mellitus Patients in a Tertiary Care Hospital** MURALIKRISHNAN, K. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences. 15: 54-58 p. 2016.

HAUGAA, K. H. et al. Impact of left ventricular hypertrophy on QT prolongation and associated mortality. **Heart Rhythm**, v. 11, n. 11, p. 1957-65, Nov 2014. ISSN 1547-5271.

HIRAKAWA, Y. et al. Impact of visit-to-visit glycemic variability on the risks of macrovascular and microvascular events and all-cause mortality in type 2 diabetes: the ADVANCE trial. **Diabetes Care**, v. 37, n. 8, p. 2359-65, Aug 2014. ISSN 1935-5548. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24812434> >.

ISBISTER, G. K.; PAGE, C. B. Drug induced QT prolongation: the measurement and assessment of the QT interval in clinical practice. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 76, n. 1, p. 48-57, 2013. ISSN 0306-5251/1365-2125. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3703227/> >.

JACOBSON, M. et al. Heart Rate Variability Time Analyses of the Streptozotocin-Diabetic Rat. **The Journal of Engineering Research [TJER]; Vol 4, No 1 (2007)DO - 10.24200/tjer.vol4iss1pp64-68**, 12/01/ 2007. Disponível em: < <https://journals.squ.edu.om/index.php/tjer/article/view/28> >.

JERMENDY, G.; KOLTAI, M. Z.; POGÁ TSA, G. QT interval prolongation in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients with cardiac autonomic neuropathy. **Acta**

diabetologia latina, v. 27, n. 4, p. 295-301, 1990// 1990. ISSN 1432-5233. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF02580933> >.

JOHNSON, A. R. et al. Cafeteria Diet-induced Obesity Causes Oxidative Damage in White Adipose. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 473, n. 2, p. 545-550, 03/28 2016. ISSN 0006-291X/1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4862365/> >.

JOSEPH, D. R. THE RATIO BETWEEN THE HEART-WEIGHT AND BODY-WEIGHT IN VARIOUS ANIMALS. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 10, n. 4, p. 521-528, 05/06/received 1908. ISSN 0022-1007/1540-9538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2124536/> >.

JUNQUEIRA JR, L. F. **Disfunção autonômica cardíaca. In: Porto C.C. (editor): Doenças do Coração -Tratamento e Reabilitação. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, Cap. 58, pág. 306-311. 1998.**

KALRA, S. et al. Place of sulfonylureas in the management of type 2 diabetes mellitus in South Asia: A consensus statement. **Indian J Endocrinol Metab**, v. 19, n. 5, p. 577-96, 2015 Sep-Oct 2015. ISSN 2230-8210. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26425465> >.

KARAM, T. K. et al. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 280-286, 2013. ISSN 1516-0572.

KE, C. et al. Mortality and Cardiovascular Risk of Sulfonylureas in South Asian, Chinese and Other Canadians with Diabetes. **Can J Diabetes**, v. 41, n. 2, p. 150-155, Apr 2017. ISSN 2352-3840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27776891> >.

KITTNAR, O. Electrocardiographic changes in diabetes mellitus. **Physiol Res**, v. 64 Suppl 5, p. S559-66, 2015. ISSN 0862-8408.

KONOPELSKI, P.; UFNAL, M. Electrocardiography in rats: a comparison to human. n. 1802-9973 (Electronic), 20160718 DCOM- 20170403 2016. Disponível em: < http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/65/65_717.pdf >.

KRONER, Z. The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? **Altern Med Rev**, v. 14, n. 4, p. 373-9, Dec 2009. ISSN 1089-5159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20030463> >.

KUCZMANNOVÁ, A. et al. Agrimonia eupatoria L. and Cynara cardunculus L. Water Infusions: Comparison of Anti-Diabetic Activities. **Molecules**, v. 21, n. 5, 2016. ISSN 1420-3049.

KUMAR, N. T. et al. Postmortem heart weight: relation to body size and effects of cardiovascular disease and cancer. **Cardiovasc Pathol**, v. 23, n. 1, p. 5-11, Jan-Feb 2014. ISSN 1054-8807.

LA ROVERE, M. T.; CHRISTENSEN, J. H. The autonomic nervous system and cardiovascular disease: role of n-3 PUFAs. **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 1-10, 8// 2015. ISSN 1537-1891. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1537189115000403> >.

LIN, W. H.; WRIGHT, J. M. Risk of sulfonylurea drugs is underappreciated. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 35, n. 3, p. 820, 2000. Disponível em: < <http://www.onlinejacc.org/content/35/3/820.2.abstract> >.

LLOYD-JONES, D. M. et al. Defining and Setting National Goals for Cardiovascular Health Promotion and Disease Reduction. The American Heart Association's Strategic Impact Goal Through 2020 and Beyond. **Circulation**, 2010. Disponível em: < <http://circ.ahajournals.org/content/early/2010/01/20/CIRCULATIONAHA.109.192703.abstract> >.

LOPES, P. F. F. et al. **Aplicabilidade Clínica da Variabilidade da Frequência Cardíaca**. Clinical Applications of Heart Rate Variability. OLIVEIRA, M. I. B. D. Rev Neurocienc. 21: 600-603 p. 2013.

LUND, L. H. et al. Prevalence, correlates, and prognostic significance of QRS prolongation in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. **European Heart Journal**, v. 34, n. 7, p. 529-539, 2013. ISSN 0195-668X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehs305> >.

MACEDO, I. C. et al. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 189-196, 11// 2012. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978112003592> >.

MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control**. PUSKA, P. Geneva: World Health Organization 2011.

MIKI, T. et al. Does glycemic control reverse dispersion of ventricular repolarization in type 2 diabetes? **Cardiovascular Diabetology**, v. 13, n. 1, p. 125, 2014// 2014. ISSN 1475-2840. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s12933-014-0125-8> >.

MOZAFFARIAN, D. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2015 Update. **Circulation**, v. 131, n. 4, p. e29, 2015. Disponível em: < <http://circ.ahajournals.org/content/131/4/e29.abstract> >.

MUSTAFA, S. B. et al. Review-Medicinal plants and management of Diabetes Mellitus: A review. **Pak J Pharm Sci**, v. 29, n. 5 Suppl, p. 1885-1891, Sep 2016. ISSN 1011-601X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28476719> >.

NASCIMENTO, O. J. M. D.; PUPE, C. C. B.; CAVALCANTI, E. B. U. Diabetic neuropathy. **Revista Dor**, v. 17, p. 46-51, 2016. ISSN 1806-0013.

NETO, M. M. R. **Conceito e Valor das Derivações Unipolares dos Membros**. Revista de Medicina: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: 55-73 p. 1948.

NICOLAU, J. C. et al. Diretriz de interpretação de eletrocardiograma de repouso. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 80, p. 1-18, 2003. ISSN 0066-782X.

NUNES, M. D. O. et al. **Variabilidade da Frequência Cardíaca e Sistema Nervoso Autônomo** RUBIRA, M. C. XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba 2007.

OKOSHI, K. et al. Miocardiopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, p. 160-167, 2007. ISSN 0004-2730.

OLIVEIRA, C. S. V.; FURUZAWA, G. K.; REIS, A. F. Diabetes Mellitus do Tipo MODY. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p. 186-192, 2002. ISSN 0004-2730.

PAIVA, F. A. et al. Carqueja (*Baccharis trimera*) Protects against Oxidative Stress and β -Amyloid-Induced Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2015, p. 740162, 2015. ISSN 1942-0994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26236426> >.

PANIKKATH, R. et al. Prolonged Tpeak-to-tend interval on the resting ECG is associated with increased risk of sudden cardiac death. **Circ Arrhythm Electrophysiol**, v. 4, 2011// 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCEP.110.960658> >.

PARK, S. W. et al. Excessive Loss of Skeletal Muscle Mass in Older Adults With Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. 11, p. 1993, 2009. Disponível em: < <http://care.diabetesjournals.org/content/32/11/1993.abstract> >.

PHUNG, O. J. et al. Sulphonylureas and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. **Diabet Med**, v. 30, n. 10, p. 1160-71, Oct 2013. ISSN 1464-5491. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23663156> >.

PICKHAM, D.; FLOWERS, E.; DREW, B. J. HYPERGLYCEMIA IS ASSOCIATED WITH QTc PROLONGATION AND MORTALITY IN THE ACUTELY ILL. **The Journal of cardiovascular nursing**, v. 29, n. 3, p. 264-270, May-Jun 2014. ISSN 0889-4655/1550-5049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4140190/> >.

PINHAS-HAMIEL, O.; ZEITLER, P. Acute and chronic complications of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. **The Lancet**, v. 369, n. 9575, p. 1823-1831, //26 ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673607608216> >. Acesso em: 2007/6/1/.

PITTELLA, J. E. H.; DUARTE, J. E. Prevalência e padrão de distribuição das doenças cerebrovasculares em 242 idosos, procedentes de um hospital geral, necropsiados em Belo Horizonte, Minas Gerais, no período de 1976 a 1997. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 60, p. 47-55, 2002. ISSN 0004-282X.

POLAR®. **Heart Rate Variability (HRV)**: Support 2017.

POVOA, R.; SOUZA, D. D. **Análise crítica do eletrocardiograma e do ecocardiograma na detecção da hipertrofia ventricular esquerda** Critical review of the electrocardiogram and echocardiogram on the diagnosis of the left ventricular hypertrophy. SOUZA, D. D. Revista Brasileira de Hipertensão. 15: 81-89 p. 2008.

PRATS, E. et al. Energy intake of rats fed a cafeteria diet. **Physiology & Behavior**, v. 45, n. 2, p. 263-272, 2// 1989. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031938489901285> >.

QIAN, C. et al. High-Fat Diet/Low-Dose Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes in Rats Impacts Osteogenesis and Wnt Signaling in Bone Marrow Stromal Cells. **PLoS ONE**, San Francisco, CA USA, v. 10, n. 8, p. e0136390, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4546646/> >.

RADOVANOVIC, C. A. T. et al. **Hipertensão arterial e outros fatores de risco associados às doenças cardiovasculares em adultos**. SANTOS, L. A. Rev. Latino-Am. Enfermagem 2014.

RADOVITS, T. et al. An Altered Pattern of Myocardial Histopathological and Molecular Changes Underlies the Different Characteristics of Type-1 and Type-2 Diabetic Cardiac Dysfunction. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, p. 728741,

2015. ISSN 2314-6745/2314-6753. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4300149/> >.

REED, M. J. et al. A new rat model of type 2 diabetes: The fat-fed, streptozotocin-treated rat. **Metabolism**, v. 49, n. 11, p. 1390-1394, 2000/11/01 2000. ISSN 0026-0495. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026049500516539> >.

RENO, C. M. et al. Severe Hypoglycemia–Induced Lethal Cardiac Arrhythmias Are Mediated by Sympathoadrenal Activation. **Diabetes**, v. 62, n. 10, p. 3570, 2013. Disponível em: < <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/62/10/3570.abstract> >.

ROBOZ, G. J. et al. Prevalence, Management, and Clinical Consequences of QT Interval Prolongation During Treatment With Arsenic Trioxide. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 33, p. 3723-3728, 2014/11/20 2014. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2013.51.2913> >. Acesso em: 2017/06/02.

RODRIGUES JUNIOR, L. F. et al. Chronic enalapril treatment increases transient outward potassium current in cardiomyocytes isolated from right ventricle of spontaneously hypertensive rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 390, n. 3, p. 225-234, Mar 2016. ISSN 1432-1912. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27915452> >.

ROGLIC, G. WHO Global report on diabetes: A summary. **International Journal of Noncommunicable Diseases**, v. 1, n. 1, p. 3-8, 2016. Disponível em: < <http://www.ijncd.org/article.asp?issn=2468-8827> >.

ROLIM, L. C. D. S. P. et al. Neuropatia autonômica cardiovascular diabética: fatores de risco, impacto clínico e diagnóstico precoce. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, p. e24-e32, 2008. ISSN 0066-782X.

ROTH, G. A. et al. Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013. **Circulation**, v. 132, n. 17, p. 1667-78, Oct 27 2015. ISSN 0009-7322.

SCHWARTZ, P. J.; CROTTI, L.; INSOLIA, R. Long-QT Syndrome. **Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology**, v. 5, n. 4, p. 868, 2012. Disponível em: < <http://circep.ahajournals.org/content/5/4/868.abstract> >.

SHEN, M. J.; ZIPES, D. P. Role of the Autonomic Nervous System in Modulating Cardiac Arrhythmias. **Circulation Research**, v. 114, n. 6, p. 1004, 2014. Disponível em: < <http://circres.ahajournals.org/content/114/6/1004.abstract> >.

SHUKIA, R. et al. Medicinal plants for treatment of diabetes mellitus. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, New Delhi, v. 15, n. Suppl 1, p. 169-177, 2000. ISSN 0970-19150974-0422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3454085/> >.

SILVA, G. J. J. et al. Critical analysis of autoregressive and fast Fourier transform markers of cardiovascular variability in rats and humans. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 386-396, 2009. ISSN 0100-879X.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 35-40, 2002. ISSN 0102-695X.

SKOVSTØ, S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. **J Diabetes Investig**, v. 5, n. 4, p. 349-58, Jul 2014. ISSN 2040-1116. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25411593> >.

SPOSITO, A. C. et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, p. 2-19, 2007. ISSN 0066-782X.

SRINIVASAN, K. et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 4, p. 313-320, 10// 2005. ISSN 1043-6618. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661805001039> >.

STUCKEY, M. I.; PETRELLA, R. J. Heart rate variability in type 2 diabetes mellitus. **Crit Rev Biomed Eng**, v. 41, n. 2, p. 137-47, 2013. ISSN 0278-940X (Print)

0278-940x.

TABISH, S. A. Is Diabetes Becoming the Biggest Epidemic of the Twenty-first Century? **International Journal of Health Sciences**, v. 1, n. 2, p. V-VIII, 2007. ISSN 1658-3639. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3068646/> >.

TANNUSE, L. R. M. **Neuropatia autonômica no diabetes: a importância de uma complicação pouco investigada**. Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto. 14: 59-64 p. 2015.

TARVAINEN, M. P. et al. Complexity of heart rate variability in type 2 diabetes - effect of hyperglycemia. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc**, v. 2013, p. 5558-61, 2013. ISSN 1557-170X (Print)

1557-170x.

_____. **Cardiac Autonomic Dysfunction in Type 2 Diabetes – Effect of Hyperglycemia and Disease Duration**. Frontiers in Endocrinology. LAITINEN, T. P.: Frontiers Media S.A. 5: 130 p. 2014.

TARVAINEN, M. P.; NISKANEN, J.-P. **Kubios HRV Analysis: User's Guide. Version 2.0 beta**. NISKANEN, J.-P. Biosignal Analysis and Medical Imaging Group. Department of Physics. University of Kuopio, FINLAND.: 1-66 p. 2006.

TOKATLI, A. et al. Prolonged Tp-e Interval, Tp-e/QT Ratio and Tp-e/QTc Ratio in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **Endocrinol Metab (Seoul)**, v. 31, n. 1, p. 105-12, Mar 2016. ISSN 2093-596X (Print)

2093-596x.

VANDERLEI, F. M. et al. Heart rate variability in healthy adolescents at rest. **Journal of Human Growth and Development**, v. 22, p. 173-178, 2012. ISSN 0104-1282.

VANDERLEI, L. C. M. et al. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 24, p. 205-217, 2009. ISSN 0102-7638.

VANHOOSE, L. et al. Electrocardiographic changes with the onset of diabetes and the impact of aerobic exercise training in the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat. **Cardiovascular Diabetology**, v. 9, n. 1, p. 56, 2010// 2010. ISSN 1475-2840. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2840-9-56> >.

VOULGARI, C.; TENTOLOURIS, N.; STEFANADIS, C. The ECG Vertigo in Diabetes and Cardiac Autonomic Neuropathy. **Experimental Diabetes Research**, v. 2011, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2011/687624> >.

WAGNER, M. B. **Medindo a ocorrência da doença: prevalência ou incidência?** *Jornal de Pediatria*: 157-162 p. 1998.

WALLOT, S. et al. Using complexity metrics with R-R intervals and BPM heart rate measures. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 211, 2013. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3741573/> >.

WALTENBERGER, B. et al. Natural Products to Counteract the Epidemic of Cardiovascular and Metabolic Disorders. **Molecules**, v. 21, n. 6, 2016. ISSN 1420-3049.

WHO. **Global report on diabetes**. Geneva: World Health Organization 2016.

WHO, W. H. O. **Top ten causes of death worldwide**. Media centre: World Health Organization 2017.

YANG, Z. H.; PENG, X. D. Effects of valsartan on diabetic cardiomyopathy in rats with type 2 diabetes mellitus. **Chin Med J (Engl)**, v. 123, n. 24, p. 3640-3, Dec 2010. ISSN 0366-6999 (Print)0366-6999.

YAP, Y. G.; CAMM, A. J. Drug induced QT prolongation and torsades de pointes. **Heart**, v. 89, n. 11, p. 1363-1372, 2003. ISSN 1355-6037/1468-201X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1767957/> >.

YIN, F. C. et al. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. **Am J Physiol**, v. 243, n. 6, p. H941-7, Dec 1982. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513.

ZGHEBI, S. S. et al. Examining Trends in Type 2 Diabetes Incidence, Prevalence and Mortality in the UK between 2004 and 2014. **Diabetes Obes Metab**, Apr 07 2017. ISSN 1462-8902.

ZHANG, M. et al. The Characterization of High-Fat Diet and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes Rat Model. **Experimental Diabetes Research**, v. 2008, p. 9, 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2008/704045> >.