

**KLEITON AUGUSTO DOS SANTOS SILVA**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO PRÉVIO SOBRE A FUNÇÃO RENAL,  
DISFUNÇÃO AUTONÔMICA E ATIVIDADE NERVOSA SIMPÁTICA RENAL  
NO DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL, EM RATOS.**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de São Paulo  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências – Nefrologia

**São Paulo**

**2011**

**KLEITON AUGUSTO DOS SANTOS SILVA**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO PRÉVIO SOBRE A FUNÇÃO RENAL,  
DISFUNÇÃO AUTONÔMICA E ATIVIDADE NERVOSA SIMPÁTICA RENAL  
NO DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL, EM RATOS.**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de São Paulo  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências – Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Nestor Schor

Co-orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Nayda Parísio  
de Abreu

**São Paulo**

**2011**

## Ficha catalográfica

Silva, Kleiton Augusto dos Santos

**Efeitos do exercício físico prévio sobre a função renal, disfunção autonômica e atividade nervosa simpática renal no diabetes mellitus experimental, em ratos** / Kleiton Augusto dos Santos Silva – São Paulo, 2011

121f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina – Programa de Pós-graduação em Nefrologia.

Título em inglês: Effects of previous exercise training on renal function, autonomic dysfunction, and renal sympathetic nerve activity in rats with experimental diabetes.

**1 - Exercício físico prévio, atividade nervosa simpática renal, disfunção autonômica, função renal, sensibilidade barorreflexa, Diabetes Mellitus e progressão da doença renal.**

Esta pesquisa recebeu o suporte financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) sob o protocolo com número 2008/07709-7, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico) e da FOR (Fundação Oswaldo Ramos).

Dedico esta dissertação as pessoas que sempre creditaram sua confiança  
cegamente nos meus sonhos.  
Muito Obrigado!

## AGRADECIMENTO

*É com muita alegria e prazer que desenvolvo esta pequena parte e não menos importante da minha dissertação, agradecer as pessoas que de forma direta e indireta me ajudaram, aconselharam, estimularam a finalização desta dissertação é reconhecer a confiança que estas pessoas tiveram na minha escolha de vida.*

*Agradeço a Deus, por simplesmente, de alguma maneira que não cabe à mim explicar, ter me colocado numa família maravilhosa e me permitir ter amigos verdadeiros.*

*Aos meus pais Paulo e Marly e ao meu irmão Kleilton por todo apoio e confiança e principalmente amor que tem por mim, sem vocês seria muito difícil chegar a esta etapa da minha vida pessoal e profissional. Amo vocês. Agradeço a minha vó Maria, que mesmo sem entender o que faço aqui, reza e torce por mim todos os dias, Obrigado vovó.*

*À minha namorada Isabelle que desde o momento em que nos conhecemos sabia que eu tinha um plano de vida e mesmo assim confiou em mim, sem questionar e sempre apoiar minhas decisões. Por sempre estar ao meu lado, por me amar. Te amo meu amor.*

*Ao professor Dr. Nestor Schor, meu orientador, que mesmo sabendo das minhas dificuldades me acolheu em seu laboratório e confiou no meu potencial. Sua experiência profissional e principalmente humildade perante seu imenso conhecimento é exemplo para muitos pesquisadores e alunos. Obrigado professor.*

*À professora Dr<sup>a</sup> Nayda Parísio de Abreu, minha co-orientadora, meu primeiro contato na Nefrologia. Agradeço toda a atenção profissional e pessoal no início da minha vida em São Paulo. Acreditou na minha inocência acadêmica e me fez acreditar que conseguiria crescer nesta área.*

*Agradeço a professora Dr<sup>a</sup> Maria Cláudia Irigoyen e a professora Dr<sup>a</sup> Kátia de Angelis, por abrirem as portas de seus laboratórios no InCor e na Universidade São Judas. Agradeço a confiança e a oportunidade de conhecer pessoas que desde Maceió já admirava pelos trabalhos publicados na área de treinamento físico.*

*Ao meu primeiro Mestre, Wcleuton Silva. Professor, agradeço muito por confiar e me fazer acreditar que meu sonho era e ainda é possível. Suas palavras de incentivo com certeza fizeram diferença nas minhas escolhas.*

*Aos meus amigos de sempre aqui na Nefrologia Rafael e Rodolfo. Estamos no caminho certo para o nosso crescimento profissional, sabemos que crescimento nesta área somente se faz com confiança, amizade e conhecimento. Agradeço a vocês dois por me proporcionarem momentos de muita alegria e discussões científicas.*

*Ao meu amigo Cristiano Mostarda um “monstro” de conhecimento na área cardiovascular e treinamento físico. Aprendi muito com você, sua paciência é sua principal arma e estar ao seu lado nesta área é algo que me orgulha muito.*

*Agradeço aos meus amigos do GEER – Grupo de Estudos em Exercício e Rim, Juliana, Natália, Fernando, Dauster, Clévia, Yuri, Evelyn, Carol, Izabel,*

*Andrei. Vocês são simplesmente sensacionais. Obrigado por juntos fazermos parte do GEER.*

*Aos integrantes do Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Renal, Dr<sup>a</sup> Clara por sua paciência, Luciana por toda ajuda, Prof. Dr. Vicente Teixeira por todos seus ensinamentos que com certeza ajudaram a enobrecer esta dissertação. E em especial que agradecer a Marcelo Naves e Renata Tassetano, por tudo que fizeram por mim, dentro e fora da Nefro.*

*As meninas do laboratório de Rim e Homônios da professora Dr<sup>a</sup> Dulce Casarini. Zaira, Dani Arita, Amanda, Juliana Perez, Maísa, Dani Aragão, Marie, Rosely, Fer Roncchi, Fernanda Barrinha e ao meu parceiro Rodrigo Yokota. Muito obrigado pela amizade e em especial obrigado a alguns por fazer a minha primeira viagem internacional ser inesquecível.*

*Ao pessoal da Secretaria da Nefrologia, Pablito (força meu amigo), Michael, Priscilla, Paulo, Jaderson e Alexandre, valeu por tudo gente.*

*Aos meus amigos do Laboratório de Hipertensão Experimental do InCor, Leandro, Maikon, Ivana, Chris Malfitano, Karen Flues, Dudu, Fernando, Celsinho, Pamella, Édson Moreira, Roberto Nascimento, Bruno, Diego, Marcos. Agradeço especialmente a Georgia Cândido, por toda ajuda que sempre me deu, mesmo não estando mais no laboratório se propôs a me ajudar. Muito obrigado a todos.*

*Aos integrantes do laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UNIFESP, sob orientação do Professor Dr. Ruy Campos e Professora Dr<sup>a</sup> Cássia Bergamaschi. Aos alunos Érika, Adilson, Thaís, Núbia, Neuli, Toninho e Airton.*

*Aos meus amigos de Maceió que me acompanharam nesta vida de mudança para São Paulo. Victor e Pedrinho, muito obrigado por serem meus amigos. Agradeço também ao Vandré pela amizade, incentivo e por me ajudar em muitas coisas. Obrigado galera por fazermos parte hoje da República dos Fiada.*

*Agradeço ao meu amigo Francis que sempre foi meu melhor amigo. Mesmo à distância provou que a amizade verdadeira é aquela que o tempo não consegue acabar.*

*Agradeço à FAPESP, por todo apoio financeiro e principalmente pela confiança depositada nos meu conhecimento científico.*

*É impossível agradecer à todos que de certa forma torceram por mim nesta minha caminhada, familiares e amigos que de certa forma me ajudaram nesta fase da minha vida. Por tanto, é com grande prazer que agradeço esta força que mesmo oculta, me ajudou a crescer.*

*Obrigado!*

## SUMÁRIO

**Lista de abreviaturas e siglas**

**Lista de figuras**

**Lista de tabelas**

**Resumo**

**Abstract**

### **INTRODUÇÃO**

<b>1.1 Diabetes</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Alterações cardiovasculares e autonômicas no diabetes</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Diabetes e função renal</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Diabetes e atividade nervosa simpática renal</b>	<b>6</b>
<b>1.5 Treinamento físico</b>	<b>8</b>
<b>1.4.1 Treinamento físico e função renal</b>	<b>9</b>
<b>1.4.2 Treinamento físico e alterações cardiovasculares</b>	<b>10</b>

<b>2. OBJETIVO GERAL</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Objetivos específicos</b>	<b>12</b>

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

<b>3.1 Animais e grupos de estudo</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Gaiola metabólica (GM)</b>	<b>14</b>
<b>3.3 Coleta e preparo da urina</b>	<b>14</b>
<b>3.4 Dosagens bioquímicas urinárias e plasmáticas</b>	<b>14</b>
<b>3.5 Coleta de sangue</b>	<b>15</b>
<b>3.6 Treinamento físico</b>	<b>15</b>
<b>3.6.1 Adaptação a esteira</b>	<b>15</b>
<b>3.6.2 Teste de esforço físico</b>	<b>16</b>
<b>3.6.3 Protocolo de treinamento físico</b>	<b>16</b>
<b>3.7 indução do diabetes</b>	<b>16</b>
<b>3.8 Dosagem de glicemia</b>	<b>17</b>
<b>3.9 Avaliação ecocardiográfica</b>	<b>17</b>
<b>3.10 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas</b>	<b>18</b>
<b>3.10.1 Canulação</b>	<b>18</b>
<b>3.10.2 Registro de pressão arterial</b>	<b>19</b>
<b>3.10.3 Avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores</b>	<b>20</b>
<b>3.11 Análise dos sinais hemodinâmicos</b>	<b>21</b>
<b>3.11.1 Pressão arterial e frequência cardíaca</b>	<b>21</b>
<b>3.11.2 Sensibilidade dos pressorreceptores</b>	<b>22</b>
<b>3.11.3 Análise da variabilidade da pressão sistólica</b>	<b>22</b>
<b>3.11.4 Análise da variabilidade do intervalo de pulso</b>	<b>22</b>
<b>3.12 Atividade nervosa simpática renal</b>	<b>23</b>
<b>3.14 Análise estatística</b>	<b>23</b>



<b>4. RESULTADOS</b>	
<b>4.1 Efeito do treinamento físico no diabetes</b>	<b>25</b>
4.1.1 Peso corporal	25
4.1.2 Glicemia	26
4.1.3 Velocidade máxima atingida em teste de esforço	26
4.1.4 Função renal	28
4.1.4.1 Creatinina sérica e Clearance de creatinina	28
4.1.4.2 Proteinúria	29
4.1.4.3 Fração de excreção de Sódio e Potássio	31
4.1.5 Pressão arterial e frequência cardíaca	32
4.1.6 Sensibilidade barorreflexo	34
4.1.7 Variabilidade da frequência cardíaca e variabilidade da pressão arterial	35
4.1.8 Atividade nervosa simpática renal	37
4.1.9 Avaliação ecocardiográfica	38
4.1.9.1 Morfometria	38
4.1.9.2 Função sistólica e diastólica	40
4.1.9.3 Índice de função global	41
4.1.10 Correlação	42
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>57</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	<b>58</b>
<b>9 ANEXO: ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO</b>	<b>81</b>

## Lista de abreviaturas e siglas

AF-	Banda de alta frequência
ANSR-	Atividade nervosa simpática renal
BF-	Banda de baixa frequência
Desac. E-	Desaceleração da onda E
DM-	Diabetes Mellitus
FC-	Frequência cardíaca
FCI-	Frequência cardíaca intrínseca
FE-	Fração de ejeção
GLUT 4-	Transportador de glicose 4
GM-	Gaiola metabólica
IBR-	Índice de bradicardia reflexa
IFG-	Índice de função global
IP-	Intervalo de pulso
ITR-	Índice de taquicardia reflexa
IVSDIA-	Espessura do septo intraventricular em diástole
LVDIA-	Diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole
LVPWDIA-	Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole
MEC-	Matriz extracelular
MVE - corríg.-	Massa do ventrículo esquerdo corrigido
PA-	Pressão arterial
PAD-	Pressão arterial diastólica
PAM-	Pressão arterial média
PAS-	Pressão arterial sistólica
RMSSD-	Raiz quadrada média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes
SHR-	Ratos espontaneamente hipertensos
STZ-	Estreptozotocina
TF-	Treinamento físico
TFG-	Taxa de filtração glomerular
TRIV-	Tempo de relaxamento isovolumétrico
VAR PAS-	Variância da pressão arterial sistólica
VAR RR-	Variância dos intervalos RR
VCF-	Fração de velocidade (de contração) circunferencial do ventrículo esquerdo
VFC-	Variabilidade da frequência cardíaca
VPA-	Variabilidade da pressão arterial

## Lista de figuras

**Figura 1:** Velocidade máxima atingida em teste de esforço (Km/h) final dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).

**Figura 2:** Clearance de creatinina final (ml/min/kg) dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).

**Figura 3:** Proteinúria final (mg/24hr) dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).

**Figura 4:** Fração de excreção de Na<sup>+</sup> final (%) dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).

**Figura 5:** Fração de excreção de K<sup>+</sup> final (%) dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).

**Figura 7:** Sensibilidade barorreflexa (bpm/mmHg) avaliada pelas respostas taquicardicas (ITR) e bradicardicas (IBR) nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).

**Figura 8:** Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes (RMSSD) nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).

**Figura 9:** Atividade simpática nervosa renal (mV/ciclo) nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).

**Figura 10:** Massa ventricular esquerda corrigida pelo peso (MVE corrig (g/kg)), nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).

**Figura 11:** Fração de ejeção (%) nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).

**Figura 12:** Correlação entre Proteinúria (mg/24hr) e Atividade nervosa simpática renal (mV/ciclo) nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).

**Figura 13:** Correlação entre Proteinúria (mg/24hr) e Variância dos intervalos RR (ms<sup>2</sup>) nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).

## Lista de tabelas

**Tabela 1:** *Peso corporal (g) inicial, final da 4ª semana e final dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).*

**Tabela 2:** *Glicemia (mg/dL) inicial e final dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).*

**Tabela 3:** *Velocidade máxima atingida em teste de esforço (Km/h) inicial, final da 4ª semana e final nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).*

**Tabela 4:** *Creatinina sérica (mg/dL) inicial e final nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) diabético treinado prévio (DTP).*

**Tabela 5:** *Clearance de creatinina (ml/min/kg) inicial e final dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).*

**Tabela 6:** *Proteinúria (mg/24hr) inicial e final nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).*

**Tabela 7:** *Hemodinâmica avaliada pela pressão arterial (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).*

**Tabela 8:** *Sensibilidade barorreflexa (bpm/mmHg) avaliada pelas respostas taquicardicas (ITR) e bradicardicas (IBR) nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).*

**Tabela 9:** *Variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e variabilidade da pressão arterial (VPA) no domínio do tempo dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).*

**Tabela 10:** *Variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da pressão arterial (VPA), no domínio da frequência nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).*

**Tabela 11:** *Atividade simpática nervosa renal (ASNR) dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).*

**Tabela 12:** *Morfometria cardíaca dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).*

**Tabela 13:** *Função sistólica e diastólica dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).*

**Tabela 14:** *Índice de função global do miocárdio dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).*

## Resumo

**Silva, KA.** *Efeitos do exercício físico prévio sobre a função renal, disfunção autonômica e atividade nervosa simpática renal no diabetes experimental, em ratos.* (Dissertação). São Paulo: Disciplina de Nefrologia, Universidade Federal de São Paulo.

**Introdução:** O exercício físico (EF) tem sido utilizado como uma intervenção terapêutica no tratamento de doenças crônico-degenerativas como o Diabetes Mellitus (DM) que pode causar complicações renais e cardiovasculares. No entanto, pouco se sabe sobre a intervenção prévia ao estabelecimento da doença na modulação fisiológica e o impacto médico nessas disfunções. Nosso objetivo no presente trabalho foi estudar os efeitos do EF prévio sobre a atividade nervosa simpática renal (ANSR), controle autonômico do sistema cardiovascular e função renal de ratos diabéticos por estreptozotocina.

**Métodos:** Ratos Wistar foram divididos em 5 grupos: controle (C, n=8), diabético (D, n=8), controle treinado (CT, n=8), diabético treinado (DT, n=8) e diabético treinado prévio (DTP, n=8) e foram submetidos a 10 semanas de treinamento (grupos CT e DT) ou 14 semanas (grupo DTP). Medidas metabólicas, função renal, ANSR, modulação autonômica, barorreflexo e ecocardiograma foram mensurados.

**Resultados:** EF prévio reduziu a proteinúria no grupo DTP ( $36,9 \pm 10,2$  mg/24 h) comparado ao grupo D ( $90,6 \pm 5,7$  mg/24 h,  $p < 0,05$ ) e atenuou esta medida em relação ao grupo DT ( $46,8 \pm 4,1$  mg/24 h), o EF prévio também diminuiu a fração de excreção de  $\text{Na}^+$  ( $0,72 \pm 0,06$  %) quando comparado ao grupo D ( $2,40 \pm 0,30$  %,  $p < 0,05$ ) e atenuou esta média em relação ao grupo DT ( $0,99 \pm 0,02$  %). Além disso, o EF prévio normalizou a ANSR no grupo DTP quando comparado ao grupo D ( $23,6 \pm 0,6$  mV/ciclo vs.  $18,1 \pm 1,7$  mV/ciclo,  $p < 0,05$ ), respectivamente, e melhorou a variabilidade da frequência cardíaca, assim como, o barorreflexo.

**Conclusão:** Esse estudo demonstrou que o EF prévio é uma importante ferramenta terapêutica com a finalidade de aumentar a segurança e trazer maiores benefícios à saúde, no que concernem as alterações renais e cardiovasculares provocadas pelo DM. Assim, dados indicam que deve haver uma necessidade de realizar o EF em pessoas com alto risco de desenvolver DM, para minimizar futuros impactos na função cardiovascular e renal induzidos pelo DM.

**Palavras-chave:** Exercício físico prévio, atividade nervosa simpática renal, disfunção autonômica, função renal, sensibilidade barorreflexa, Diabetes Mellitus e progressão da doença renal.

## Abstract

**Silva KA.** *Effects of previous exercise on renal function, autonomic dysfunction and renal sympathetic nerve activity in experimental diabetes, in rats.* (Thesis). São Paulo: Division of Nephrology, Federal University of São Paulo.

**Background:** The exercise training (ET) has been recognized as an important therapeutic intervention for the chronic degenerative diseases such as Diabetes Mellitus (DM) that cause renal and cardiovascular complications. However, little is known if previous ET intervention modulates the physiological and medical impact caused by these dysfunctions. We investigated the effects of previous ET on renal sympathetic nerve activity (RSNA), cardiovascular autonomic control and renal function in rats with experimental diabetes.

**Methods:** Male Wistar rats were divided in five groups: control (C, n= 8), diabetic (D, n= 8), trained control (TC, n= 8) or diabetic (TD, n= 8) and previous trained diabetic (PTD, n= 8). TC and TD were submitted to 10 wks and PTD to 14 wks of ET. Renal function, proteinuria, RSNA and autonomic modulation and baroreflex sensitivity (BRS) were evaluated.

**Results:** Previous ET reduced proteinuria in PTD group ( $36.9 \pm 10.2$  mg/24 h) as compared to D group ( $90.6 \pm 5.7$  mg/24 h,  $p < 0.05$ ) and attenuated in relation to TD group ( $46.8 \pm 4.1$  mg/24 h), fractional excretion of sodium in PTD group ( $0.72 \pm 0.06$  %) as compared to D group ( $2.40 \pm 0.30$  %,  $p < 0.05$ ) and attenuated in relation to TD group ( $0.99 \pm 0.02$  %). Moreover, previous ET normalizes RSNA in PTD when compared to D group ( $23.6 \pm 0.6$  mV/cycle vs.  $18.1 \pm 1.7$  mV/cycle,  $p < 0.05$ ), respectively and improve heart rate variability as well as BRS compared to D group.

**Conclusion:** This study demonstrates that the previous ET is an important therapeutical tool in order to increase the safety and bring greater healthy benefits, with respect to cardiovascular and kidney alterations due to DM. Thus, these data indicates a necessity to performe ET in patients with high risk of DM in order to minimize future impact on cardiovascular and renal function induced DM.

**Key words:** Previous exercise training, renal sympathetic nerve activity, autonomic dysfunction, renal function, baroreflex sensitivity, Diabetes Mellitus, progression of renal disease.

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus (DM) possui características de doença epidêmica, atingindo proporções mundiais. No ano 2000, adultos com 20 anos ou mais de idade chegavam a aproximadamente 171 milhões acometidos pela doença. A estimativa para o ano de 2030 é que 366 milhões de pessoas tenham DM (1). De acordo com *Center for disease control* nos Estados Unidos, em 2008, a estimativa era que cerca de 24 milhões de americanos tinham a doença. No espectro mundial isso corresponde a 8% da população americana (2). No Brasil um estudo multicêntrico realizado em 1980, determinou uma prevalência de 7,6% (3).

O diabetes não tem sua etiologia totalmente conhecida sendo considerada multifatorial. Os principais fatores associados ao aumento da incidência do DM é o sedentarismo, devido à inatividade física, obesidade, maior expectativa de vida, hábitos alimentares inadequados, desenvolvimento tecnológico, urbanização, dentre outros (4, 5).

O DM é uma doença metabólica caracterizada pela hiperglicemia, resistência à insulina, intolerância à glicose, hipertensão arterial, nefropatia diabética, proteinúria, disfunção autonômica, neuropatia periférica, disfunção endotelial, disfunção erétil como exemplos (6-9).

Esta doença metabólica pode ser classificada em tipo I e II. O tipo I é causado por uma importante incapacidade das células *beta* do pâncreas produzirem insulina e, portanto, são dependentes de insulina exógena para seu controle glicêmico. A manifestação da doença microvascular tem maior

incidência neste tipo de diabetes. Já o tipo II oferece resistência nas células-alvo à insulina, levando também a um estado de hiperglicemia (10-13).

A principal causa de morte nos portadores de DM é a doença cardiovascular, portanto, na presença de hiperglicemia crônica ocorrem alterações no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, decorrentes tanto de defeito da secreção de insulina, como de alterações na ação insulínica. A insulina por ser um poderoso hormônio anabólico, exerce grande influência nos estoques de glicogênio hepático e muscular, síntese de triglicerídeos e proteínas e inibe a proteólises (6, 14). Um estudo demonstrou que um pequeno aumento na glicemia de jejum em sujeitos não diabéticos, mesmo na faixa de normalidade pode ser prejudicial para uma liberação de insulina estimulada pela glicose. O que pode caracterizar um breve período de resistência à insulina (15).

## **1.2 Alterações cardiovasculares e autonômicas no diabetes**

O DM é acompanhado de complicações crônicas características, genericamente denominadas de doença microvascular (específica do diabetes), doença macrovascular (aterosclerose com início mais precoce no diabetes) e doença neuropática (16). Hipertensão, disfunções do ventrículo esquerdo e disfunção endotelial, compreendem algumas dessas complicações crônicas relacionadas com o DM.

O modelo experimental de DM por estreptozotocina (STZ), que é um agente citotóxico seletivo para células *beta* pancreática (17), tem sido utilizado por muitos investigadores no estudo das disfunções metabólicas e cardiovasculares da doença. Ratos diabéticos por STZ apresentam muitas alterações semelhantes às observadas em humanos, tais como hiperglicemia,



hipoinsulinemia, glicosúria, poliúria, perda de peso, neuropatia, nefropatia e cardiopatia (8, 18-20). Além disso, o volume extracelular se mostra bastante aumentado neste modelo animal de DM, devido ao alto nível de glicemia encontrada (21). Para avaliarmos as diversas alterações impostas pelo DM, pesquisadores têm utilizado constantemente o modelo de DM por STZ, almejando uma melhor compreensão das disfunções renais e do controle autonômico do sistema cardiovascular. Estudos têm demonstrado redução da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) desde 5 até 80 dias após a indução do DM (18, 19, 22-24). Os mecanismos envolvidos nestas disfunções ainda não estão perfeitamente esclarecidos, mas existem evidências consistentes do envolvimento de alterações na frequência cardíaca intrínseca no tônus vagal e no controle reflexo de frequência cardíaca (barorreflexo e quimiorreflexo) neste prejuízo cardiovascular (8). Além disto, pesquisadores têm evidenciado prejuízo na sensibilidade dos presso- e quimiorreceptores em ratos diabéticos (19).

O estudo do barorreflexo é uma ferramenta utilizada como forma de entendimento dos ajustes de pressão arterial e frequência cardíaca em diferentes doenças. Farah e cols. demonstraram em 2007 que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e diabéticos induzidos por STZ tinham um reflexo de bradicardia diminuído quando relacionado apenas aos animais SHR (25).

A neuropatia diabética acomete tanto o sistema nervoso somático (principalmente nervos sensitivos), como o sistema nervoso autônomo. O comprometimento das funções autonômicas cardíacas, causado pela neuropatia autonômica que está ligado a uma diminuição da modulação

parassimpática e/ou aumento da simpática, desempenha um papel importante no aparecimento de outras complicações como hipertensão (26)

Há evidências de que a hemodinâmica renal também está alterada no início do DM experimental e que seria um dos principais responsáveis pela evolução da nefropatia diabética (27-30), sendo que nesta fase inicial da doença, ainda não há lesões estruturais no glomérulo (31) que justifiquem esta alteração na dinâmica glomerular. No entanto, alguns pesquisadores relataram um aumento de cerca de 30% no glomérulo de ratos diabéticos com somente quatro de dias de indução (32).

Distúrbios na variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da pressão arterial (VPA) têm demonstrado alto valor prognóstico no espectro clínico e experimental. O estudo das bandas de alta (AF) e baixa frequência (BF) e o estudo no domínio do tempo, desempenha um importante papel no entendimento da modulação autonômica (26, 33-37). Um aumento na banda BF da VFC e VPA tem sido associado com acontecimentos fatais e não fatais de doenças cardiovasculares, renais e morte súbita (38).

A regularidade na adesão a um programa de exercícios físicos é associada com uma melhora no sistema nervoso autonômico. Uma diminuição dos valores da banda BF e da razão BF/AF foi encontrada em animais hipertensos que realizaram exercícios físicos regulares de forma voluntária (38). Além disso, houve ainda uma redução da VPA que é associada com um aumento da atividade parassimpática e/ou diminuição da atividade simpática (38). Em animais diabéticos Mostarda e cols. (2009b), mostraram que o treinamento periodizado de intensidade moderada aumenta o tônus vagal e aumento da frequência cardíaca intrínseca (FCI), vale ressaltar que em animais

diabéticos por STZ há uma diminuição da FCI. Assim podemos correlacionar estes resultados com uma melhora na modulação autonômica do coração em animais treinados.

### **1.3 Diabetes e Função renal**

O diabetes pode gerar complicações renais como a nefropatia diabética, e a condição de hiperglicemia não controlada favorece ao aparecimento desta complicação, assim como a predisposição genética aliada a fatores ambientais podem agravar a situação e ser completamente relevante no início e progressão da doença (39). Alteração na hemodinâmica renal pode acometer a função renal. Elevada taxa de filtração glomerular está presente entre pacientes com diabetes tipo I (40), estando este paciente sujeito a progredir para uma doença renal crônica (41).

Estudos experimentais revelaram que há um desarranjo da estrutura da parede glomerular na nefropatia diabética, tornando a membrana basal menos seletiva às cargas (42). Prejuízo em proteínas de podócito como a podocina podem estar presente em pessoas com DM e a perda de néfrina precede a excreção de albumina no decorrer da lesão renal (43).

Hipertrofia tubuloepitelial e glomerular e espessamento de membranas basais glomerulares e tubulares são características estruturais presentes nos rins da maioria dos diabéticos, no entanto, expansão e esclerose mesangial por maior produção de matriz extracelular (MEC) são alterações precoces que ocorrem nos pacientes que desenvolveram nefropatia diabética. Remodelamento defeituoso da MEC decorre principalmente de um aumento de colágeno tipo IV (seu principal componente), laminina e fibronectina (44). Essas alterações ocorrem antes do espessamento da membrana basal glomerular

(45). Alterações nos transportadores de água e sódio ao longo dos túbulos renais também ocorrem, Vidotti e colaboradores em 2008, demonstraram que co-transportador  $\text{Na}^+$ /Glicose estava aumentado em animais diabéticos induzidos por STZ. O aumento desse transportador demonstra a tentativa dos túbulos renais em reabsorver a glicose excedente filtrada pelo glomérulo.

O desenvolvimento da nefropatia diabética pode ser retardado com o controle de seus fatores de risco. Há estudos na literatura que relacionam a excreção urinária de albumina com bom controle glicêmico (46), uso de estatinas (47), inibidores da ECA e bloqueadores do receptor AT1 (48) e melhora da função autonômica (49).

A albumina é a proteína urinária mais frequente, elevações nesta proteína se caracteriza por manifestações de lesão renal em pacientes com DM, doenças glomerulares e nefrosclerose hipertensiva (50). A identificação destes marcadores e de fatores de risco modificáveis como a hipertensão, assim como o bom controle glicêmico podem minimizar os efeitos deletérios na função renal. A proteinúria pode ser considerada fator de risco para pacientes com diabetes e hipertensão, vale ressaltar que em danos tubulares e glomerulares a albuminúria pode estar presente, com o tempo esta pode progredir para proteinúria (33).

#### **1.4 Diabetes e atividade nervosa simpática renal (ANSR)**

A atividade simpática renal participa diretamente no controle tônico da hemodinâmica renal. O registro da atividade eferente do nervo simpático renal (NSR), tem sido de difícil determinação. Essa atividade registrada em animais acordados apresenta-se em uma faixa de baixa frequência (0,5 a 2,0 Hz) (51). Com base nesses dados, alguns estudos têm sugerido que, sob condições

fisiológicas, a frequência basal da atividade eferente do nervo simpático renal seja muito baixa para alterar a hemodinâmica renal, mas suficiente para influenciar a taxa de secreção de renina e reabsorção tubular de sódio (51). A estimulação direta, ou reflexa, do nervo simpático renal em ratos, promove uma diminuição do fluxo sanguíneo renal e aumento na resistência vascular renal (51), diminui a excreção de água e Na<sup>+</sup>, além diminuir a filtração glomerular (52). Um estudo demonstrou que ocorre uma diminuição na resposta da ANSR, seja excitatória ou inibitória, reflexa à estimulação de receptores renais e químicos no DM experimental (53). Além disso, a excreção de sódio está diminuída no início do diabetes, humano e experimental, em ratos essa desordem é corrigida pela desnervação renal (54).

Os nervos renais participam efetivamente na gênese da hipertensão (55), no DM a auto-regulação renal pode estar prejudicada e esse prejuízo pode ser caracterizado pelas alterações do feedback túbulo-glomerular e miogênico (30, 56-58).

Bell e cols. (2006) demonstraram em ratos diabéticos por STZ que em um período de duas semanas com altos níveis de glicemia que o fluxo sanguíneo renal estava aumentado assim como houve aumento da taxa de filtração glomerular. Esse resultado sugere que o diabetes descompensado possui um importante papel na progressão da nefropatia diabética.

Há interações entre os nervos renais e o controle barorreflexo desses nervos (55). Com a disfunção simpática e parassimpática em pacientes diabéticos e em modelos experimentais de DM (59, 60), ocorre um prejuízo do controle barorreflexo dos nervos renais, porém, após duas semanas de DM por STZ, um estudo demonstrou que o controle barorreflexo da atividade simpática

do nervo renal estava inalterado (61). Outros pesquisadores demonstraram em um modelo diferente de DM experimental utilizando camundongos OVE26 que desenvolvem hiperglicemia severa com 30 dias após o nascimento que houve um prejuízo tanto da inibição quanto da excitação simpática pelo barorreflexo. Além disso, houve redução das respostas da pressão arterial média à estimulação do nervo depressor aórtico (62).

### **1.5 Treinamento físico**

O exercício físico regular é uma ferramenta recomendada e utilizada no tratamento do diabetes mellitus (8, 63-67). De acordo com a recomendação da Associação Americana de Diabetes de 2005, todos os tipos exercício incluindo atividades de lazer, esportes recreacionais, competição profissional podem ser realizados por pessoas portadoras de diabetes tipo I, desde que seja mantido um rígido controle da glicemia e esteja livre de complicações hemodinâmicas, renais, neurogênicas, entre outras.

O treinamento físico (TF) moderado é o mais recomendado pela maioria das diretrizes aplicadas ao diabetes (66, 67). A prática regular de exercícios físicos é agora considerada uma ferramenta eficaz no controle da progressão da nefropatia, disfunção autonômica, hipertensão, entre várias outras doenças (24, 64, 68-70).

#### **1.4.1 Treinamento físico e Função renal**

O exercício provoca grandes alterações na hemodinâmica renal facilitando a excreção de proteínas na urina (71). Durante o exercício ocorre uma vasodilatação periférica e vasoconstrição esplâncnica, assim, os rins sofrem uma diminuição do fluxo sanguíneo que é diretamente proporcional a intensidade de exercício, este pode diminuir em até 80% do valor basal. A

hidratação basal do indivíduo que está se exercitando pode influenciar de forma negativa ou positiva no nível de diminuição do fluxo sanguíneo, quanto mais hidratado estiver o indivíduo menor foi a diminuição do fluxo renal (72, 73).

Diferentes níveis de intensidade de exercício também podem alterar a taxa de filtração glomerular (TFG). Exercício de leve intensidade inicialmente provoca uma tendência a aumentar a TFG, já os exercícios realizados moderadamente e de alta intensidade tendem a diminuir a TFG (74). A liberação de vários hormônios promove alteração na reabsorção e secreção de íons e solutos nos túbulos.

Proteinúria é comum em exercício de alta intensidade e atletas de alto desempenho reincidentes a este tipo de treinamento estão mais propícios a este fenômeno (74, 75).

Diferentes taxas de proteinúria estão relacionadas com a duração e a intensidade do exercício (74, 76, 77). Em exercício moderado, a proteinúria tende a ser de origem glomerular. Já em exercício intenso, podemos observar a proteinúria tanto de origem glomerular quanto de origem tubular. (78, 79).

Na nefropatia diabética, é comum a ocorrência de proteinúria pós-exercício físico, porém o aparecimento de proteínas não significa um aumento na disfunção renal nos portadores de DM (71).

#### **1.4.2 Treinamento físico e alterações cardiovasculares**

Utilizando modelos experimentais, pesquisadores demonstraram que o tônus vagal representado pela atividade parassimpática, estava aumentado nos animais diabéticos treinados moderadamente. Esse fato sugere que houve um aumento na bradicardia de repouso que é uma adaptação fisiológica ao

treinamento aeróbio regular e favorece a maior eficiência no bombeamento cardíaco (64). Além disso, tem sido evidenciada também a diminuição do estresse oxidativo e da hipertrofia cardíaca (68, 80). Em animais diabéticos, o TF se mostrou eficaz em reverter as alterações da frequência cardíaca e da pressão arterial, melhorou a função contrátil do coração, a sensibilidade dos pressorreceptores e ainda reduziu as taxas de mortalidade nesses animais (24).

Relatos da literatura têm demonstrado que o treinamento altera o controle glicêmico, reduzindo a hemoglobina glicada (81, 82), melhorando o aporte de nutrientes nos músculos (83) e melhorando a variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial (26, 64). Essas alterações provocadas pelo treinamento ainda englobam adaptações em nível de receptor. Os captadores de glicose (GLUT 4) aumentam sua expressão gênica (65), o aumento desta proteína na membrana muscular contribui para uma diminuição nos níveis de glicemia e este aumento correlaciona-se com a sensibilidade da insulina ao seu receptor.

A capacidade de realização de exercícios físicos está atenuada em humanos e animais diabéticos (64, 84), essa atenuação está ligada principalmente ao descontrole glicêmico, o que conseqüentemente leva a uma rigidez dos vasos de condutância e assim diminuição da capacidade física devido ao baixo nível de aporte sanguíneo (85).

Apesar de ser exaustivamente encontrado na literatura estudos demonstrando os benefícios do treinamento físico moderado modulando alterações funcionais e morfológicas em várias patologias, é escasso o



conhecimento científico sobre a intervenção prévia do treinamento físico em modelos experimentais.

Nesse sentido, com a utilização do TF como uma intervenção cada vez mais frequente e necessária ao tratamento não-farmacológico do DM no âmbito das complicações renais e cardiovasculares e no controle das alterações autonômicas, faz-se necessário alguns esclarecimentos quanto à realização de um TF prescrito previamente ao estabelecimento da doença. Assim o presente estudo demonstra as alterações provocadas pelo tanto pelo TF realizado após o estabelecimento da doença, quanto ao TF prévio ao diabetes experimental por STZ.

## **2 OBJETIVO GERAL**

1 – Avaliar os efeitos do exercício físico prévio sobre a função renal, disfunção autonômica e atividade simpática do nervo renal de ratos com DM por STZ.

### **2.1 Objetivos específicos**

1 – Avaliar e determinar os principais parâmetros moduladores que possam influenciar o DM.

2 – Analisar o comportamento da função renal urinária e plasmática através de variáveis como: *clearance* de creatinina, proteinúria e sódio e potássio, em ratos com DM por STZ submetidos ao TF prévio ou não.

3 – Verificar possíveis alterações da hemodinâmica sistêmica (PAS, PAD, PAM e FC), disfunção autonômica (Variabilidade da FC e sensibilidade barorreflexa) e a atividade simpática do nervo renal de todos os grupos estudados nesta pesquisa.

4 – Avaliar as alterações morfofuncionais cardíacas através do ecocardiograma.

### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e grupos de estudo

Foram utilizados ratos Wistar, pesando 150-180 gramas, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo. Todos os procedimentos foram submetidos ao Comitê de Ética da UNIFESP/EPM e aprovado pelo mesmo sob o processo 0878/08. Os animais foram mantidos agrupados, em ambiente com temperatura controlada (22° - 24°C) e com luz controlada em ciclo de 12 horas (claro:escuro). Água e comida foram oferecidas de modo irrestrito, e a dieta era normoprotéica (12% de proteínas).

Todos os grupos foram acompanhados por 14 semanas, entretanto, os grupos controle, controle treinado, diabético, diabético treinado, não realizaram nenhuma intervenção nas primeiras 4 semanas, exceto a coleta de urina, teste de esforço e acompanhamento do peso corporal. Os animais do grupo diabético treinado prévio realizaram todos os experimentos realizados pelos outros grupos e treinaram de forma sistemática e programada durante estas primeiras 4 semanas, caracterizando um treinamento físico prévio ao estabelecimento do DM. Todos os grupos diabéticos possuem 10 semanas de diabetes.

Segue os grupos do estudo:

- **Grupo controle (C)**, n= 8, grupo controle do estudo;
- **Grupo controle treinado (CT)** n=8, grupo que realiza protocolo de treinamento físico durante 10 semanas sem a presença de diabetes;
- **Grupo diabético (D)**, n=8, grupo diabético sedentário de 10 semanas;

- **Grupo diabético treinado (DT)**, n=8, grupo que é submetido a protocolo de treinamento semelhante ao grupo DTP, porém durante somente 10 semanas;
- **Grupo diabético treinado prévio (DTP)**, n=8, grupo que realiza um protocolo de TF de 14 semanas, sendo 4 destas de TF prévio ao estabelecimento de diabetes.

### **3.2 Gaiola metabólica (GM)**

Todos os animais foram levados à GM no início e ao final do protocolo. Inicialmente o peso de cada rato foi mensurado (balança da marca Micronal®) e anotado. Seguindo-se com a distribuição dos mesmos nas GMs individuais para a coleta de urina objetivando as mensurações posteriores de marcadores de função renal. Estes foram mantidos por 24 horas com acesso irrestrito à água e alimentação padrão em pó. Após este período foi iniciada a coleta de urina, sob vaselina líquida (86).

### **3.3 Coleta e preparo da urina**

Após ser coletada na GM, a urina teve seu volume anotado (diurese) e a vaselina líquida aspirada com Pipeta Pasteur. A urina foi centrifugada a uma velocidade de 3.000 rpm durante 10 minutos, a fim de serem retirados os debrís. As urinas foram aliquotadas em tubos eppendorfs® e congeladas em freezer -20° C.

### **3.4 Dosagens bioquímicas urinárias e plasmáticas**

Foram utilizados Kits da Labtest Diagnóstica® para obter as dosagens de creatinina (método do picrato com íntima relação com o método usando reagente de Lloyd (87) e com os métodos de cromatografia de troca iônica (88)).

Sódio e o Potássio foram dosados através do Fotômetro de Chamas da marca Micronal<sup>®</sup> B-462.

A fração de excreção de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> foi calculada a partir da fórmula abaixo, (onde U = valores urinários, P = valores plasmáticos):

$$FE = [U_{Na\ ou\ K} (mEq/L) \times P_{CREAT} (mg/dL) / P_{Na\ ou\ K} (mEq/L) \times U_{CREAT} (mg/dl)] \times 100$$

Os valores do *clearance* de creatinina foram calculados pela fórmula UV/P (onde U = valores de creatinina urinária em mg/dL, V = volume urinário de 24 horas em mL/minutos e P = valores de creatinina plasmática em mg/dL).

A proteinúria foi mensurada pelo método de ensaio enzimático colorimétrico sendo esta última mediante o uso do kit comercial (Sensiprot, Labtest diagnóstica).

### **3.5 Coleta de sangue**

Uma amostra de sangue foi retirada da região do plexo retro-orbital dos animais, estes foram previamente anestesiados com uma mistura de Ketamina Ketamina (90 mg/kg) e xylazina (10 mg/kg).

### **3.6 Treinamento físico**

#### **3.6.1 Adaptação a esteira**

Antes do início do protocolo de treinamento e do teste de esforço os ratos foram submetidos a um período de adaptação a esteira rolante motorizada (Imbramed TK-01) por 10 min., a uma velocidade de 0,3 km/h, uma vez ao dia por uma semana. Este período tem por finalidade diminuir o estresse sofrido pelos animais durante o teste e a aplicação do treinamento físico e não é caracterizado como treinamento físico prévio.

### **3.6.2 Teste de esforço físico**

Com o intuito de estabelecer a capacidade física máxima dos animais e elaborar a prescrição do treinamento físico dos mesmos na esteira rolante motorizada, realizamos um teste de esforço. Para realizar o teste os animais foram colocados individualmente na esteira e ficaram cerca de 10 minutos para aclimação ao ambiente, após iniciado o teste a velocidade era aumentada de forma intercalada de 0,3 Km/h a cada 3 minutos. O critério para caracterização da exaustão dos animais no teste era a incapacidade dos mesmos em acompanhar a velocidade da esteira (89, 90).

### **3.6.3 Protocolo de treinamento físico**

Após a realização do teste de esforço a prescrição do treinamento foi elaborada considerando uma intensidade moderada (40 - 60% da capacidade física máxima), durante 14 (grupo DTP) ou 10 semanas (DT e T), 5 dias por semana, alcançando no decorrer do protocolo um volume de treinamento equivalente a 1 hora, seguindo parâmetros de protocolos de treinamento em pesquisas já publicadas (24, 68, 69).

### **3.7 Indução do diabetes**

Os animais foram colocados em um contensor onde somente a cauda ficava exposta e o diabetes foi induzido por uma única injeção endovenosa (e.v.) de estreptozotocina (STZ, 50 mg/Kg, e.v., Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) pela veia da cauda (91), seguida de rápida recuperação do animal. A STZ é dissolvida em tampão citrato (0,01M, pH 4,5) e injetada cerca de 5 minutos após a diluição. Os animais foram mantidos em jejum por 6 horas antes da indução. Nos grupos não diabéticos foi injetado sob o mesmo procedimento somente com tampão citrato. Cerca de 5 dias após a indução, os

animais foram novamente submetidos a um jejum de 6 horas para verificar a ação da estreptozotocina.

### **3.8 Dosagem da glicemia**

Amostras de sangue (50  $\mu$ l) foram coletadas dos diferentes grupos experimentais para dosagem dos níveis de glicose sanguínea. Este procedimento foi realizado através do aparelho Advantage (Roche®, Suíça).

### **3.9 Avaliação ecocardiográfica**

As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do Modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia (92). Os exames foram realizados por um único observador e em cada exame foi coletado um total de cinco medidas para cada variável, sendo calculados posteriormente, a média, o desvio padrão da média e o erro padrão da média dessas medidas. O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais anestesiados com uma solução de Ketamina (90 mg/kg) e xylazina (10 mg/kg), através de injeção intra-peritoneal. Após a sedação os animais foram colocados em decúbito dorsal, em uma mesa cirúrgica apropriada para o posicionamento do transdutor no hemitórax esquerdo do animal. O equipamento utilizado foi o SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA), com transdutor de 15 MHz. As imagens foram feitas à uma frequência de 13,0 MHz, para otimização da resolução e a penetração do animal. Para registro das imagens foi utilizado gel de transmissão para ultrassom de viscosidade média/alta (General Imaging Gel, ATL, Reedsville, USA). A partir da visualização do ventrículo esquerdo (corte transversal) ao nível dos músculos papilares foi realizado o modo M e obtidas as medidas das seguintes variáveis: diâmetro diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do

ventrículo esquerdo e a espessura do septo interventricular (SIV) e da parede posterior do ventrículo esquerdo (PP) em sístole e diástole. Após a realização das medidas a massa do ventrículo esquerdo foi calculada através da utilização da seguinte fórmula matemática:  $LVM = [(DDVE+SIV+PP)^3-(DDVE)^3] \times 1,047$ , onde 1,047 ( $\text{mg}/\text{mm}^3$ ) corresponde a densidade do miocárdio. Além da massa do ventrículo esquerdo, a força de encurtamento do ventrículo esquerdo também foi calculada ( $D\% = [(DDVE-DSVE)/DDVE] \times 100$ ). Os índices de função sistólica do modo bidimensional foram obtidos a partir do método de Simpson modificado, uma vez que é um método mais fidedigno para corações infartados do que aqueles obtidos apenas a partir do modo-M.

As imagens obtidas através do Doppler foram utilizadas para calcular os parâmetros da função diastólica do ventrículo esquerdo. O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e o tempo de desaceleração da onda E. Utilizando ainda o tempo de ejeção (TE) do fluxo de via de saída do ventrículo esquerdo, foi calculada a velocidade de encurtamento circunferencial da fibra miocárdica ( $Vcf = [(DDVE-DSVE)/DDVE]/TE$ ). Embora o Vcf seja sensível a mudanças agudas da pressão arterial na sobrecarga hemodinâmica, em condições basais, na ausência de mudanças agudas da pressão arterial, o cálculo do Vcf fornece informações quanto à contratilidade miocárdica. A avaliação da hipertrofia cardíaca foi analisada pela normalização da massa do ventrículo esquerdo (g) pelo peso corporal (g).

### **3.10 Avaliações hemodinâmicas sistêmicas**

#### **3.10.1 Canulação**

No dia anterior ao registro de pressão arterial os animais foram anestesiados com Ketamina (90 mg/kg) e xylazina (10 mg/kg) para



colocação de cânulas de polietileno (PE-10, com diâmetro interno de 0,01 mm que foi conectado ao PE-50, 13 com diâmetro interno de 0,05 mm). As cânulas foram preenchidas com soro fisiológico, e posicionadas no interior da aorta abdominal e da veia cava inferior, através da artéria e veia femoral esquerdas para registro de pressão arterial, frequência cardíaca e administração de drogas, respectivamente. Através de uma pequena incisão na região inguinal esquerda em direção ao feixe vaso-nervoso as extremidades das cânulas com menor calibre (PE-10) foram introduzidas na artéria e na veia femoral. As cânulas foram fixadas com fio de algodão, na artéria e na veia e suas extremidades mais calibrosas foram passadas subcutaneamente, exteriorizadas no dorso da região cervical e fixadas com fio de algodão na pele. Após o término da cirurgia os animais foram tratados com uma única injeção intramuscular de penicilina G (Benzetacil<sup>®</sup>, Fontoura-Wyeth, 60.000U). Cada rato foi mantido em uma caixa (Plexiglas, 25x15x10 cm) durante a realização do experimento.

### **3.10.2 Registro de pressão arterial**

No dia seguinte, após 24h, o rato já acordado, localizado em uma caixa individual (Plexiglas, 25x15x10cm), e acordado, a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal pela caixa, durante todo o período do experimento. Esta extensão foi conectada a um transdutor eletromagnético (P23 Db, Gould-Statham, Oxnard, CA, EUA) que, por sua vez, conectado a um pré-amplificador (Hewlet-Packard 8805C, Puerto Rico, EUA). Sinais de pressão arterial foram obtidos e então gravados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (CODAS, 2Kz, DATAQ Instruments,

Akron, OH, EUA), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 2000 Hz por canal, para estudo dos valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca. Os valores de frequência cardíaca foram derivados do sinal pulsátil da pressão arterial.

### **3.10.3 Avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores**

O controle reflexo da circulação comandado pelos barorreceptores tem sido reconhecido também como um importante preditor de risco após evento cardiovascular. De fato, o estudo ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) forneceu evidências clínicas do valor prognóstico da sensibilidade do barorreflexo e da variabilidade da frequência cardíaca na mortalidade cardíaca pós infarto do miocárdio, independente da fração de ejeção do ventrículo esquerdo e de arritmias ventriculares (35). Dessa forma, intervenções no sentido de melhorar a sensibilidade do barorreflexo e/ou a participação do parassimpático cardíaco no controle da PA e da FC tem sido vistas como novas estratégias no manejo das doenças cardiovasculares.

Após o registro da PA e da FC em condições basais, uma extensão de aproximadamente 20 cm (PE10) foi conectada na cânula venosa para posterior injeção de drogas vasoativas.

Fenilefrina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), um potente estimulador  $\alpha_1$  cuja ação predominante se dá nas arteríolas periféricas causando vasoconstrição, foi usada para provocar aumento da pressão arterial. Esse aumento da pressão arterial é seguido de bradicardia reflexa comandada pelos pressorreceptores.

Nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, UA), um potente vasodilatador tanto de arteríolas, como de veias e cuja ação se dá por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3', 5'-guanosina monofosfato (GMP cíclico) na musculatura lisa de vasos e outros tecidos, foi usado para provocar queda da pressão arterial. Essa queda é seguida por uma resposta taquicárdica reflexa comandada pelos pressorreceptores. Após os animais terem permanecido em condições de repouso por 15 minutos, a sensibilidade dos pressorreceptores foi testada através da infusão de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio. Fenilefrina e nitroprussiato foram infundidas randomicamente entre os animais, iniciando-se a sessão com um ou outro fármaco.

### **3.11 Análise dos sinais hemodinâmicos**

#### **3.11.1 Pressão arterial e frequência cardíaca**

A análise foi feita utilizando-se programa comercial associado ao sistema de aquisição. Este programa permite a detecção de máximos e mínimos da curva de pressão batimento a batimento, fornecendo os valores de PA sistólica (PAS) e PA diastólica (PAD) pela integral da área sob a curva no tempo. A FC foi determinada a partir do intervalo entre dois picos sistólicos. Os resultados foram apresentados em valores médios e desvios padrões dos períodos em que os dados foram analisados para PA e FC. As planilhas de dados obtidas foram analisadas em programa comercial para análise (Excel 5.0), onde se calculou a média e desvio padrão de PA média (PAM), PAS, PAD e FC para cada animal.

### **3.11.2 Sensibilidade dos pressorreceptores**

Para avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores, o pico máximo ou mínimo da PAM foi comparado aos valores de PAM do período controle. Da mesma forma, a variação máxima da frequência cardíaca foi comparada com os valores de FC do período controle, imediatamente antes da infusão das drogas, para posterior quantificação das respostas através do índice de sensibilidade dos pressorreceptores calculado pela divisão da variação da FC pela variação da PA.

### **3.11.3 Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica**

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

A análise no domínio da frequência foi consistido da decomposição do sistograma pelo algoritmo paramétrico autoregressivo. Após esse remodelamento matemático, foram obtidas as potências absolutas e em unidades normalizadas (un) nas respectivas bandas de frequências pré-determinadas: baixa frequência (BF, 0,20-0,75 Hz) e alta frequência (AF, 0,75-3,0 Hz).

### **3.11.4 Análise da variabilidade do intervalo de pulso**

A variabilidade do intervalo de pulso foi obtida pela análise do tacograma a partir do registro da PAS, onde a frequência dos batimentos foi determinada pelo intervalo entre dois picos sistólicos. Para essa análise foram utilizados registros estáveis, de no mínimo 2 minutos e com frequência de amostragem

de 2.000 Hz. Também dois componentes foram obtidos na análise espectral: baixa frequência (BF, 0,20-0,75 Hz) e alta frequência (AF, 0,75-3,0 Hz). Os dados foram expressos em valores absolutos e em unidades normalizadas. O componente BF foi usado como um índice da atividade simpática. O componente AF foi usado como um índice da atividade parassimpática. A relação BF/AF indicará o balanço simpato-vagal (93).

### **3.12 Atividade nervosa simpática renal (ANSR)**

A atividade basal do nervo renal caracterizou-se por potenciais de ação que se correlacionavam com os ciclos cardíaco e respiratório. A descarga simpática renal, de caráter oscilatório, variava em fase com ciclo cardíaco, com a atividade máxima verificada na primeira metade do período diastólico. A ANSR, medida diretamente pelo registro do eletrouneurograma, foi amplificada através de um amplificador diferencial de alta impedância de entrada (520A Differential Amplifier, Tektronix, Oregon, USA) e filtrada em filtro passa banda com frequências de corte superior a 3 kHz e inferior a 100 Hz. A ANSR amostrada a 4000 Hz foi integrada e gravada simultaneamente com sinais de PA no computador (CODAS). Os valores obtidos foram processados usando o programa AT/CODAS e analisados em Excel 2000.

A ANSR foi obtida em mV/ciclo cardíaco. Para comparação entre os diferentes grupos de ratos, os valores de ANSR foram expressos como um percentual máximo de 100% e mínimo de 0% da atividade nervosa basal obtida em 5000 ciclos cardíacos.

### **3.14 Análise estatística**

Para a análise estatística dos resultados que seguem utilizamos a forma de apresentação dos valores como média  $\pm$  erro padrão, a análise de variância

de uma via (one way ANOVA), seguido pelo *post hoc* de Student Newman Keuls, foi aplicada, sendo considerado significativamente estatísticos os resultados que apresentaram o valor de  $p < 0,05$ . Para testar as devidas correlações, utilizamos pelo método de *Pearson*.

## 4 – RESULTADOS

### 4.1 Efeito do treinamento físico no DM

#### 4.1.1 Peso corporal

A tabela 1 ilustra o efeito do treinamento físico (TF) e do TF prévio sobre o peso corporal dos grupos C, D, CT, DT e DTP no período inicial, antes da indução do diabetes, nos respectivos grupos diabéticos (D, DT e DTP) (final da 4ª semana) e ao final do protocolo de estudo. Não houve diferença entre os grupos no início e ao final da 4ª semana. Após a indução com STZ os grupos diabéticos (D, DT) perderam peso em relação aos grupos normoglicêmicos (C e CT). No final do período do protocolo experimental, não encontramos diferença entre os grupos C e CT, o grupo D perdeu peso demonstrando o efeito deletério do DM e observamos neste grupo diferença em relação a todos os grupos da pesquisa (C, CT, DT e DTP). O grupo DT apesar de não atingir valores semelhantes ao grupo C e CT, obteve nitidamente um retardo na perda de peso corporal quando comparado ao grupo D. O grupo DTP, demonstrou que o período prévio de treinamento foi eficaz na manutenção do peso corporal ao longo do protocolo e ao final do TF este grupo demonstrou aumento do peso corporal.

**Tabela 1:** Peso corporal (g) inicial, final da 4ª semana e final dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT).

Fase/grupos	C	D	CT	DT	DTP
Inicial	184± 2	188± 2	184± 2	193± 2	191± 3
Final 4ª semana	321± 9,2	303± 5	321± 9,2	314± 5	311± 7
Final	405± 10	233± 6*	379± 4#	282± 11*#+	343± 18*#+\$

Valores representam média± erro padrão, \* p<0,05 vs. C; # p<0,05 vs. D; + p<0,05 vs. CT; \$ p<0,05 vs. DT. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.

#### 4.1.2 Glicemia

A avaliação da glicose sérica está representada na tabela 2. No início do protocolo todos os animais analisados apresentaram glicemia semelhante. Ao final do protocolo nos grupos estudados nesta fase, os animais do grupo C e CT não apresentaram nenhuma alteração na glicemia. No entanto, os roedores do grupo D, DT e DTP apresentaram hiperglicemia comprovando assim a eficácia da indução do DM por STZ. O grupo DT e o grupo DTP, no entanto, apesar de ser hiperglicêmico demonstrou uma redução desta variável em aproximadamente 24% em comparação ao grupo D, já o grupo DTP diminuiu sua glicemia em torno de 26% em comparação ao grupo D.

**Tabela 2:** Glicemia (mg/dL) inicial e final dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).

Fase/grupos	C	D	CT	DT	DTP
Inicial	90± 1,8	88± 2,8	92± 2	92± 2	89± 2,3
Final	87± 2,2	497± 19*	89± 2,9#	379± 20*##+	365± 19*##+

Valores representam média± erro padrão, \* p<0,05 vs. C; # p<0,05 vs. D; + p<0,05 vs. CT. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.

#### 4.1.3 Velocidade máxima atingida em teste de esforço

A tabela 3 que segue abaixo representa os valores máximos atingidos no teste de esforço (Km/h) dos grupos estudados nesta pesquisa. Os valores atingidos inicialmente e os valores atingidos ao final da 4ª semana no teste pelos animais de todos os grupos analisados nesta fase foram semelhantes, exceto o grupo DTP que ao final da 4ª semana apresentou uma maior capacidade física devido ao TF prévio. No final do período de TF, o grupo C não alterou sua capacidade física. O grupo D demonstrou uma diminuição nos

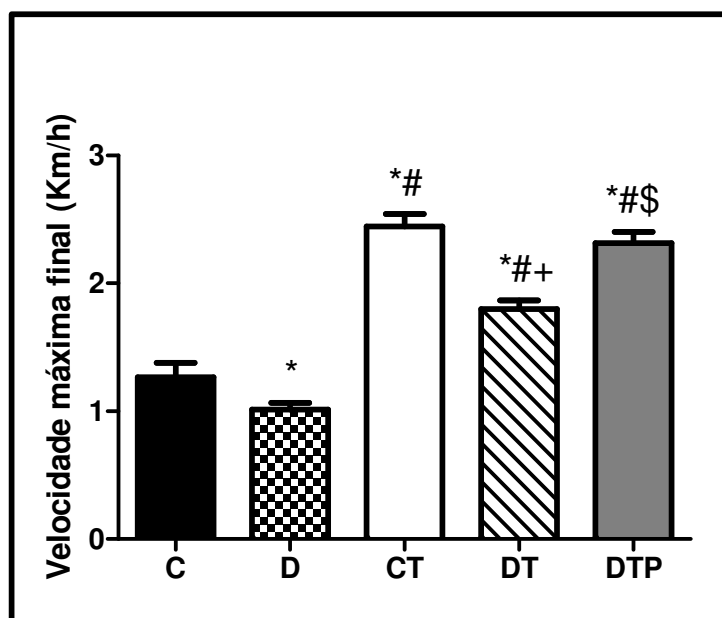


valores de velocidade em comparação aos grupos C, CT, DT e DTP. Os grupos treinados CT, DT e DTP aumentaram sua capacidade física em relação aos grupos C e D, porém o grupo DT ainda manteve níveis de capacidade física abaixo dos valores do grupo CT, já o grupo DTP demonstrou uma velocidade máxima semelhante ao grupo CT.

**Tabela 3:** Velocidade máxima atingida em teste de esforço (Km/h) inicial, final da 4ª semana e final nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT).

Fase/grupos	C	D	CT	DT	DTP
<b>Inicial</b>	1,1± 0,1	1,1± 0,1	1,1± 0,1	1,2± 0,1	1,2± 0,1
<b>Final da 4ª semana</b>	1,2± 0,1	1,2± 0,1	1,2± 0,1	1,2± 0,1	1,9± 0,1#
<b>Final</b>	1,2±0,1	1,0±0,1*	2,4±0,1*#	1,8±0,1*#+	2,3± 0,1*#

Valores representam média± erro padrão, \* p<0,05 vs. C; # p<0,05 vs. D; + p<0,05 vs. CT; \$ p<0,05 vs. DT. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.



**Figura 1:** Velocidade máxima atingida em teste de esforço (Km/h) final dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP). \*p<0,05 vs. C; # p<0,05 vs. D; + p<0,05 vs. CT; \$ p<0,05 vs. DT. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.

#### 4.1.4 Função Renal

##### 4.1.4.1 Creatinina sérica e Clearance de creatinina

Os valores para creatinina sérica e o clearance de creatinina foram obtidos através de coletas de urina realizada por 24 horas em gaiolas metabólicas, sendo analisada em dois momentos, antes de qualquer intervenção e ao final do protocolo de estudo. No início do protocolo experimental encontramos semelhança na creatinina sérica em todos os grupos. Ao final do protocolo observou-se que os animais C e CT não modificaram os valores de creatinina sérica. Os animais do grupo D apresentaram valores elevados de creatinina sérica em comparação aos grupos C, CT e DT. O grupo DT e DTP apresentou valores normalizados de creatinina sérica ao final do TF e do TF prévio.

**Tabela 4:** Creatinina sérica (mg/dL) inicial e final nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT).

Fase/grupos	C	D	CT	DT	DTP
Inicial	0,73± 0,05	0,77± 0,02	0,75± 0,03	0,72± 0,02	0,73± 0,05
Final	0,72± 0,05	1,37± 0,1 <sup>≠</sup>	0,77± 0,04	0,64± 0,05	0,70± 0,05

Valores representam média± erro padrão, <sup>≠</sup> p<0,05 vs. todos os grupos. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.

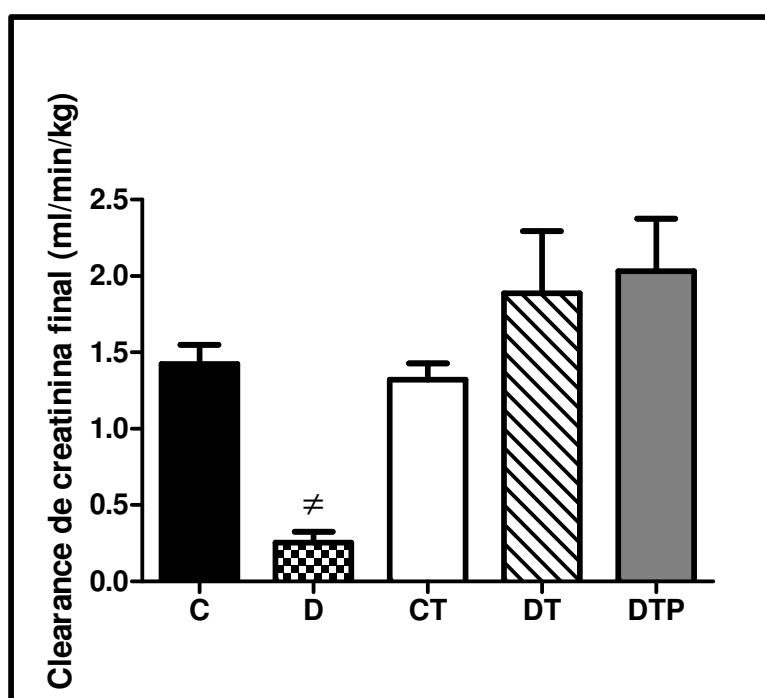
Analisando o clearance de creatinina (ml/min/kg) encontramos semelhança na avaliação inicial em todos os grupos. Ao analisar os valores finais desta variável não observamos diferença entre os grupos C, CT, DT e DTP. Entretanto quando comparamos esses grupos com grupo D verificamos que o clearance de creatinina estava diminuído de forma significativa. O grupo

DT e o grupo DTP demonstraram recuperação dos valores de clearance de creatinina após participação do protocolo de TF e do TF prévio.

**Tabela 5:** Clearance de creatinina (ml/min) inicial e final dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT).

Fase/grupos	C	D	CT	DT	DTP
Inicial	1,08±0,08	1,25±0,06	1,10±0,03	1,22±0,08	1,18±0,09
Final	1,12±0,09	0,65±0,11*	1,05±0,05#	1,79±0,37*#+	1,70±0,24*#+

Valores representam média± erro padrão, ≠ p<0,05 vs. todos os grupos. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.



**Figura 2:** Clearance de creatinina final (ml/min) dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP). ≠ p<0,05 vs. todos os grupos. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.

#### 4.1.4.2 Proteinúria

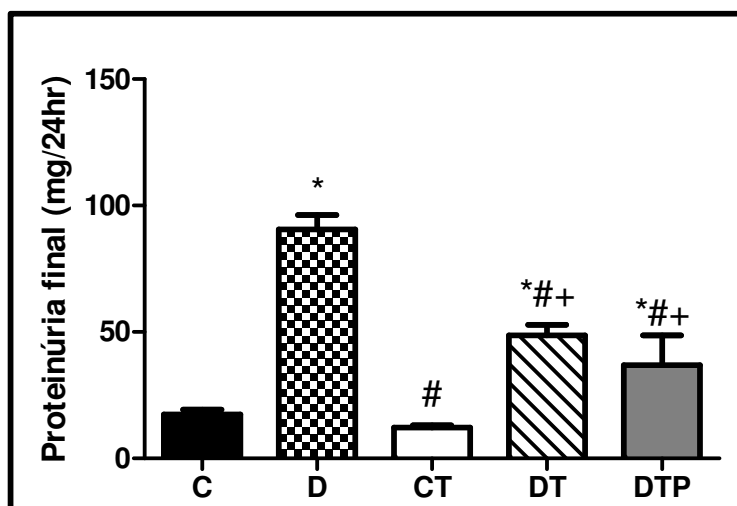
A proteinúria foi analisada através da urina coletada em GM no período de 24 horas. No início do protocolo experimental todos os grupos analisados

(C, D, CT, DT), apresentaram valores semelhantes de proteinúria. Ao final do período de TF, os grupos C e CT não modificaram seu nível de excreção de proteína na urina. O grupo D demonstrou um aumento significativo na proteinúria de 24 horas em comparação aos grupos C, CT e DT. Verificamos que a proteinúria estava aumentada no grupo DT, sendo este grupo diferente dos demais. Porém, vale ressaltar que os valores de proteinúria observado neste grupo estavam significativamente diminuídos em relação ao grupo D.

**Tabela 6:** Proteinúria (mg/24hr) inicial e final nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT).

Variável/grupo	C	D	CT	DT	DTP
<b>Inicial</b>	15,19±2,3	15,73± 1,2	14,85± 1,4	15,43± 1,5	13,42± 0,7
<b>Final</b>	17,46± 1,8	90,59± 5,7*	12,37± 0,8#	46,8± 4,1*#+	36,89± 10,2*#+

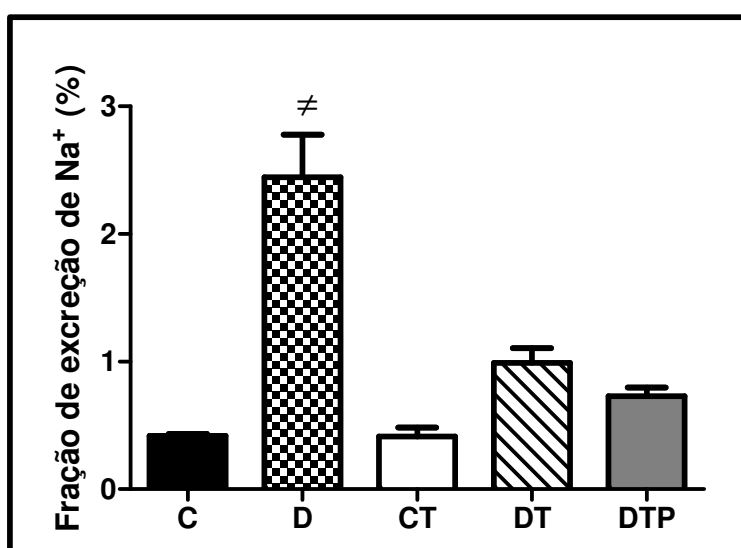
Valores representam média± erro padrão, \* p<0,05 vs. C; # p<0,05 vs. D; + p<0,05 vs. CT. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.



**Figura 3:** Proteinúria final (mg/24hr) dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP). \*p<0,05 vs. C; # p<0,05 vs. D; + p<0,05 vs. CT. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.

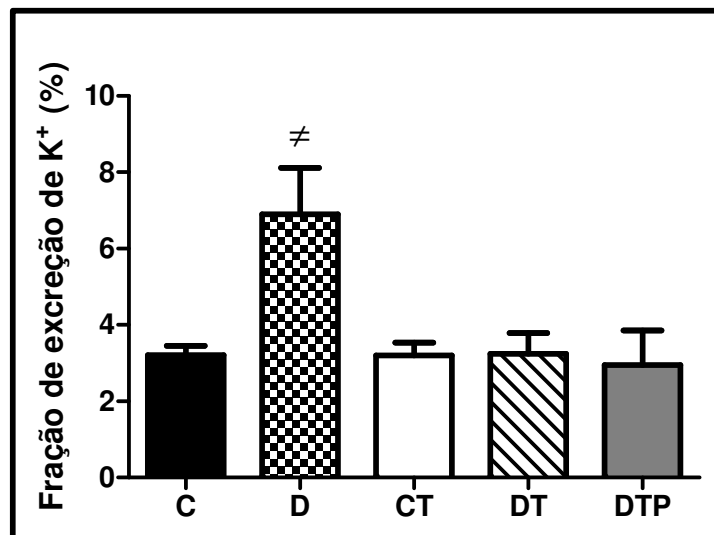
#### 4.1.4.3 Fração de excreção de Sódio e Potássio

No início do protocolo experimental não observamos diferença nos valores de excreção de  $\text{Na}^+$  (%) em nenhum grupo estudado. No entanto, podemos observar que no final do protocolo os animais diabéticos do grupo D aumentaram sua excreção de  $\text{Na}^+$  ( $2,22 \pm 0,3\%$ ) em relação a todos grupos da pesquisa estudado (C, CT, DT e DTP). Observa-se também que os animais do grupo DT ( $1,08 \pm 0,1\%$ ) apesar de apresentar valores finais de fração de excreção deste íon acima dos valores dos grupos controle ( $0,42 \pm 0,01\%$ ), também demonstra valores reduzidos em comparação com o grupo D, o grupo DTP ( $0,66 \pm 0,07\%$ ) normalizou os valores de excreção deste íon ao final da pesquisa.



**Figura 4:** Fração de excreção de  $\text{Na}^+$  final (%) dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).  $\neq p < 0,05$  vs. todos os grupos. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.

Com relação a fração de excreção de  $K^+$ , no início do protocolo experimental todos os grupos apresentaram valores semelhantes e portanto não foram diferentes entre si. A figura 5 demonstra o resultado final da fração de excreção deste íon e assim podemos observar uma atenuação na elevação da excreção nos animais do grupo C, CT, DT e DTP. O TF e o TF prévio foram eficazes na normalização da excreção de  $K^+$ , em comparação ao grupo D.



**Figura 5:** Fração de excreção de  $K^+$  final (%) dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP). ≠  $p < 0,05$  vs. todos os grupos. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.

#### 4.1.5 Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

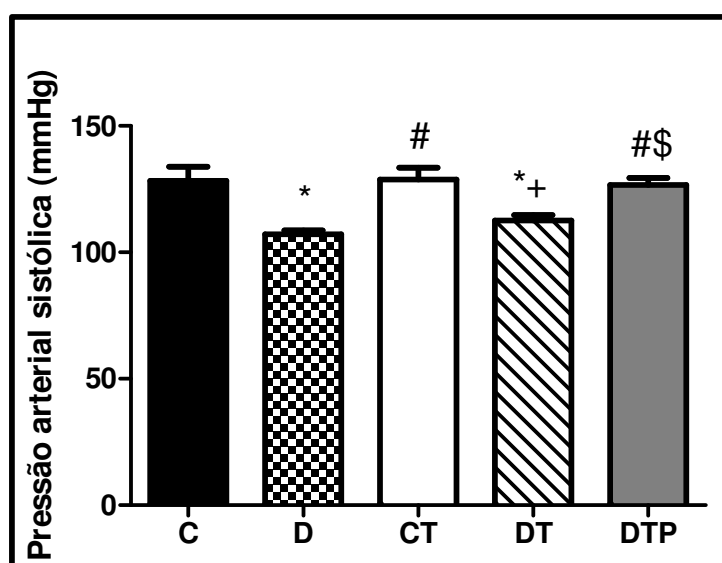
Como apresentado na tabela abaixo, os animais do grupo D apresentam hipotensão e bradicardia característica do modelo experimental. Os grupos C e CT apresentaram valores normais de pressão arterial e frequência cardíaca. O grupo DT demonstrou valores semelhantes ao grupo D nos parâmetros de

pressão arterial e frequência cardíaca. Já o grupo DTP demonstrou valores normais de PAS em comparação ao grupo D e DT.

**Tabela 7:** Hemodinâmica avaliada pela pressão arterial (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT).

Variável/grupo	C	D	CT	DT	DTP
PAS (mmHg)	128± 8	107± 1*	128± 6#	112± 3*+	126± 5#\$
PAD (mmHg)	92± 4	83± 1	86± 2	89± 4	91± 1
PAM (mmHg)	109± 6	97± 0,9	98± 1	103± 5	108± 1
FC (bpm)	326± 14	283± 9*	320± 7#	270± 5*+	300± 6\$

Valores representam média± erro padrão, \* p<0,05 vs. C; # p<0,05 vs. D; + p<0,05 vs. CT; \$ p<0,05 vs. DT. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.



**Figura 6:** Pressão arterial sistólica (mmHg) dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP). \*p<0,05 vs. C; # p<0,05 vs. D; + p<0,05 vs. CT; \$ p<0,05 vs. DT. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.

#### 4.1.6 Sensibilidade Barorreflexa

A sensibilidade barorreflexa foi representada pelo índice de bradicardia reflexa (IBR) em resposta a aumentos de PA após administração de doses crescentes de fenilefrina e pelo índice de taquicardia reflexa (ITR) em resposta a diminuição de PA após administração de doses crescentes de nitroprussiato de sódio.

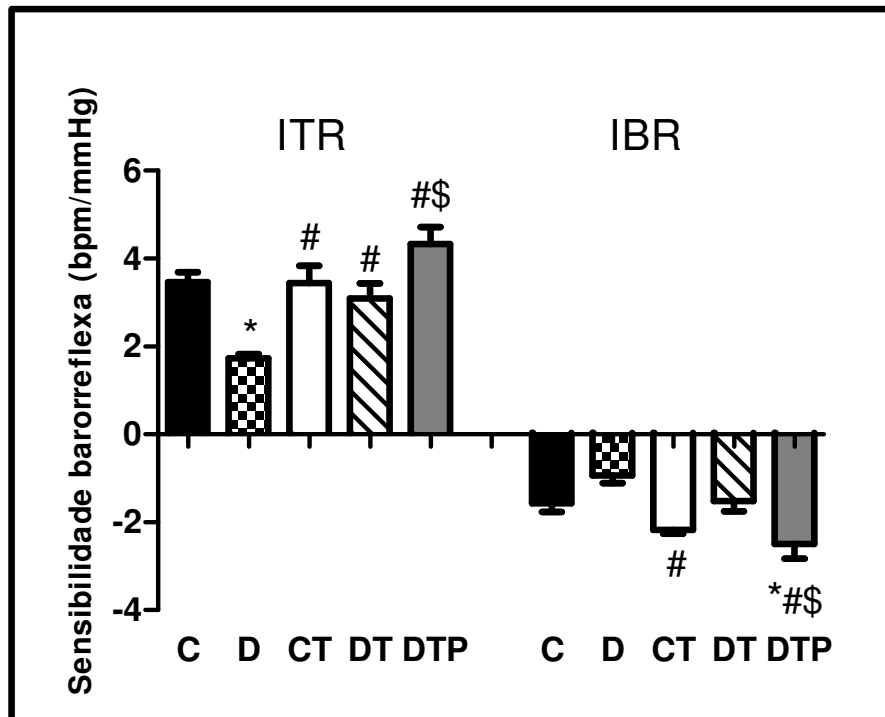
Na análise desta variável, observou-se um prejuízo do barorreflexo nos animais diabéticos do grupo D tanto no ITR, quanto no IBR. O treinamento físico no grupo DT foi eficaz em atenuar este prejuízo somente em relação ao ITR, porém houve uma tendência de atenuação sem significância estatística do IBR neste mesmo grupo quando comparado ao grupo D. Não encontramos diferença estatística entre os grupos C e CT em ambas as análises. O grupo DTP aumentou os valores tanto com relação ao ITR quanto ao IBR, em comparação ao grupo D e DT.

**Tabela 8:** Sensibilidade barorreflexa (bpm/mmHg) avaliada pelas respostas taquicardicas (ITR) e bradicardicas (IBR) nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT).

Variável/Grupos	C	D	CT	DT	DTP
ITR (bpm/mmHg)	3,19± 0,32	1,83± 0,32*	3,28± 0,28#	2,70±0,35#	3,67± 0,60#\$
IBR (bpm/mmHg)	-1,57± 0,17	-0,93±0,31	-2,17± 0,18#	-1,51± 0,26	-2,50± 0,20*#s

Valores representam média± erro padrão, \* p<0,05 vs C; # p<0,05 vs D. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.





**Figura 7:** Sensibilidade barorreflexa (bpm/mmHg) avaliada pelas respostas taquicárdicas (ITR) e bradicárdicas (IBR) nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio. \* $p < 0,05$  vs. C; #  $p < 0,05$  vs. D; \$ $p < 0,05$  vs. DT. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.

#### 4.1.7 Variabilidade da frequência cardíaca e variabilidade da pressão arterial

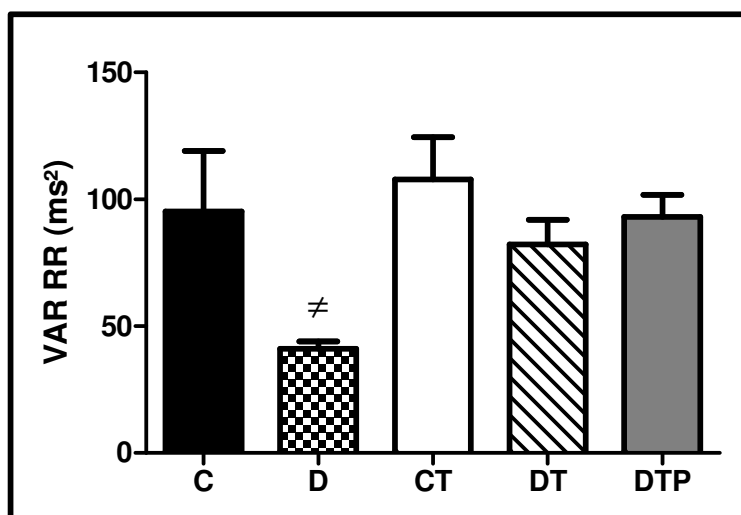
A VFC e a VPA foram avaliadas no domínio do tempo e da frequência. No que se refere ao domínio do tempo, na análise do intervalo de pulso (IP), os grupos C e CT apresentaram valores semelhantes, em relação aos grupos D e DT, o grupo DTP normalizou o IP. Na variância dos intervalos RR (VAR RR) o grupo D demonstrou diminuição dos valores nesta variável, porém os grupos DT e DTP demonstraram valores normalizados. A raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes (RMSSD) foi maior nos animais do grupo DT e no grupo DTP em comparação aos grupos C, CT e D. Na análise da variância da PAS (VAR PAS), encontramos diminuição

desta variável nos grupos diabéticos (D, DT e DTP), uma tendência a valores normais pode ser observado nos grupos diabéticos treinados (DT e DTP).

**Tabela 9:** Variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e variabilidade da pressão arterial (VPA) no domínio do tempo dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).

Variável/grupos	C	D	CT	DT	DTP
IP (ms)	185,5± 11,5	212,9± 6,60*	187,6± 5,35#	222,6± 5,60*+	200,0± 3,90\$
VAR RR (ms <sup>2</sup> )	95,1± 33,0	41,1± 2,83≠	107,8± 21,9	82,2± 12,95	93,0± 7,3
RMSSD (ms)	6,15± 0,50	5,07± 0,31	7,52± 0,51	11,50± 1,80*#+	11,20± 0,20*#+
VAR PAS (mmHg <sup>2</sup> )	24,30± 2,90	6,83± 0,44*	31,90± 3,00*#	10,60± 4,40*+	12,50± 1,70*+

Valores representam média± erro padrão, \* p<0,05 vs. C; # p<0,05 vs. D; + p<0,05 vs. CT. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.



**Figura 8:** Variância do intervalos RR normais nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP). ≠ p<0,05 vs. todos os grupos. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.

Com relação análise da VFC e da VPA no domínio da frequência, na análise das variáveis do IP, os componentes de baixa frequência (BF) que representa a modulação simpática do coração, o grupo D apresentou redução

da modulação e o treinamento realizado no grupo DT e DTP foi eficaz em atenuar esta queda.

Os grupos CT, DT e DTP foram diferentes dos grupos D na análise do componente de alta frequência (AF), que representa a modulação parassimpática para o coração. Entre os grupos treinados o grupo DT obteve em seu resultado uma diferença estatística em relação ao grupo CT e DTP. Já na análise da PAS no domínio da frequência o componente de BF foi menor nos animais diabéticos (D e DT). O grupo DTP demonstrou atenuação desta variável com relação ao grupo CT e foi superior ao grupo D e DT.

**Tabela 10:** Variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da pressão arterial (VPA), no domínio da frequência nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado(DT).

<b>Domínio da frequência - Intervalo de Pulso (IP)</b>					
<b>Variável/grupos</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>CT</b>	<b>DT</b>	<b>DTP</b>
<b>BF</b>	4,20± 0,86	1,87± 0,37 $\neq$	4,97± 1,06	4,92± 1,38	4,36± 0,65
<b>AF</b>	10,7± 2,30	6,46± 0,59	15,9± 2,30 $\#$	23,6± 2,70* $\#$ +	14,4± 1,40 $\#$ \$
<b>Domínio da frequência - Pressão Arterial Sistólica (PAS)</b>					
<b>Variável/grupos</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>CT</b>	<b>DT</b>	<b>DTP</b>
<b>BF</b>	4,30± 0,57	0,82± 0,12*	4,17± 0,96 $\#$	0,98± 0,13*+	2,29± 0,26* $\#$ +

Valores representam média± erro padrão, \* p<0,05 vs. C; # p<0,05 vs. D;  $\neq$  p<0,05 vs CT. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.

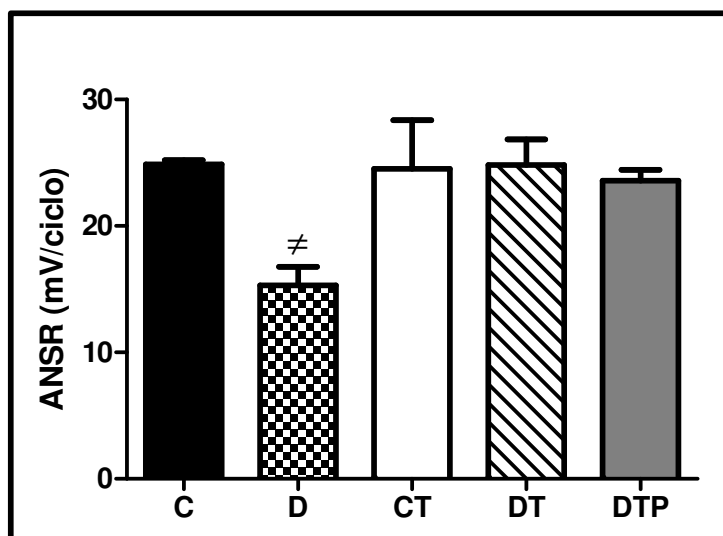
#### 4.1.8 Atividade nervosa simpática renal

A atividade simpática do nervo renal foi analisada sob captação direta dos potenciais de ação do nervo renal esquerdo. Os animais do grupo diabético (D) apresentaram valores diminuídos em relação aos demais grupos (C, CT, DT e DTP). O grupo DT e o grupo DTP demonstraram através do TF e do TF prévio uma capacidade de normalizar os prejuízos do DM nesta variável.

**Tabela 11:** Atividade nervosa simpática renal (ANSR) dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado(DT).

Variável/grupos	C	D	CT	DT	DTP
ANSR (mV/ciclo)	24,5± 0,59	18,1± 1,69 <sup>≠</sup>	24,5± 4,31	24,8± 2,50	23,6± 0,60

Valores representam média± erro padrão, <sup>≠</sup> p<0,05 vs. todos os grupos. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.



**Figura 9:** Atividade nervosa simpática renal (mV/ciclo) nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP). <sup>≠</sup>p<0,05 vs. todos os grupos. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.

#### 4.1.9 Avaliação ecocardiográfica

##### 4.1.9.1 Morfometria

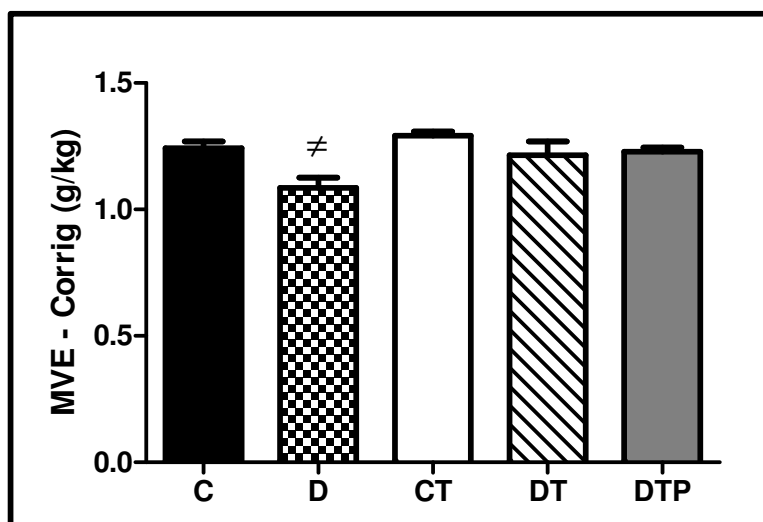
A tabela 12 apresenta os valores correspondentes a morfometria cardíaca. Variáveis como massa do ventrículo esquerdo corrigida pelo peso corporal dos animais (MVE corrigida) e diâmetro do ventrículo esquerdo (LVDIA) foram analisadas. Podemos observar que a massa ventricular esquerda estava diminuída no grupo D em comparação aos demais grupos estudados, em especial ao grupo DT e ao grupo DTP que conseguiu com o TF e com o TF prévio, respectivamente, normalizar seus valores de massa. A

espessura do septo interventricular em diástole os grupos diabéticos exercitados ou não demonstraram diminuição desta variável, porém o grupo DTP apresentou uma tendência a normalidade em comparação aos grupos D e DT.

**Tabela 12:** Morfometria cardíaca dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).

Variável/grupos	C	D	CT	DT	DTP
<b>MVE - corrig (g/kg)</b>	1,24± 0,03	1,09± 0,04 <sup>≠</sup>	1,29± 0,02	1,21± 0,05	1,23± 0,02
<b>IVSDIA (cm)</b>	0,15± 0,002	0,13± 0,005 <sup>*</sup>	0,15± 0,002 <sup>#</sup>	0,13± 0,002 <sup>*+</sup>	0,14± 0,002 <sup>+</sup>
<b>LVPWDIA (cm)</b>	0,15± 0,005	0,13± 0,005	0,16± 0,004 <sup>#</sup>	0,14± 0,006	0,14± 0,003 <sup>+</sup>
<b>LVDIA (cm)</b>	0,82± 0,01	0,76± 0,02	0,78± 0,02	0,80± 0,03	0,81± 0,01

Valores representam média ± erro padrão da média. \* p<0,05 vs. C; # vs. D. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.



**Figura 10:** Massa ventricular esquerda corrigida pelo peso (MVE corrig (g/kg)), nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP). Valores representam média ± erro padrão da média. <sup>≠</sup> p<0,05 vs. todos os grupos. Os dados foram comparados pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo *post hoc* de student Newman Keuls.

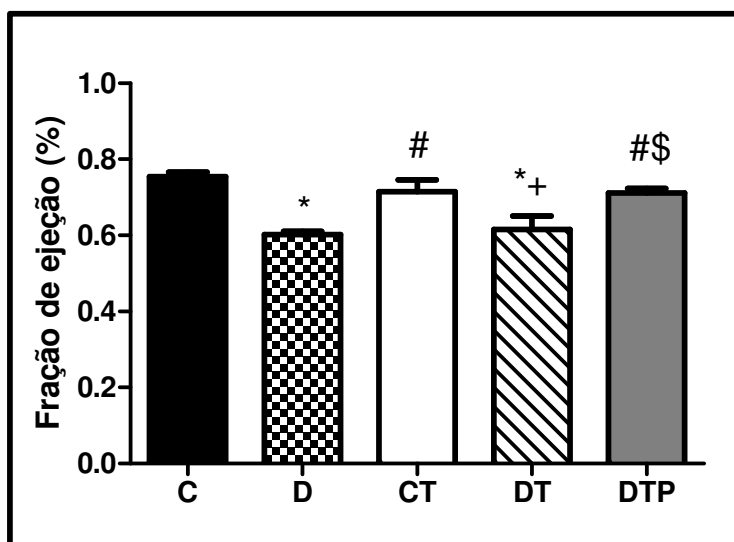
#### 4.1.9.2 Função sistólica e diastólica

A tabela 13 apresenta os valores referentes à função sistólica e diastólica. No que concerne a função sistólica analisamos a fração de ejeção e a velocidade de contração circunferencial do ventrículo esquerdo. Os animais diabéticos do grupo D apresentaram diminuição da fração de ejeção e o treinamento realizado pelo grupo DT não alterou esta variável em comparação ao grupo D. O grupo DTP aumentou a fração de ejeção em comparação aos grupos D e DT. Observam-se resultados semelhantes em relação à variável VCF em relação aos grupos D e DT. Em relação à função diastólica o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), os animais do grupo D demonstraram uma elevação, enquanto que os animais do grupo DT apresentaram valores diminuídos em relação ao grupo D e aumentados em relação ao grupo CT. O grupo DTP apresentou valores normais desta variável. Os valores de desaceleração da onda E foram semelhantes entre os grupos.

**Tabela 13:** Função sistólica e diastólica dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP).

Função sistólica					
	C	D	CT	DT	DTP
<b>FE (%)</b>	0,75± 0,01	0,60± 0,008*	0,72± 0,03#	0,61± 0,04*+	0,71± 0,01#\$
<b>VCF (circ/seg)</b>	0,005± 0,0002	0,003± 0,0002*	0,004± 0,0004#	0,003±0,0003*+	0,004± 0,0001
Função diastólica					
	C	D	CT	DT	DTP
<b>TRIV (ms)</b>	22± 2,02	32,78± 0,6*	21± 0,32*#	26,2± 2,33#+	21,78± 0,97#\$
<b>DESAC. E (ms)</b>	40,86± 0,80	39,33± 0,62	39± 0,71	39,83± 0,79	39,25± 0,64

Valores representam média ± erro padrão. \* p<0,05 vs. C; # p<0,05 vs. D; + p<0,05 vs. CT; \$ p<0,05 vs. DT. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo post hoc de Student Newman Keuls.



**Figura 11:** Fração de ejeção (%) nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado (DT) e diabético treinado prévio (DTP). Valores representam média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$  vs. C; #  $p < 0,05$  vs. D; +  $P < 0,05$  vs. CT; \$  $p < 0,05$  vs. DT. Os dados foram comparados pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo *post hoc* de student Newman Keuls.

#### 4.1.9.3 Índice de função global

A tabela abaixo representa o índice de função global do miocárdio. Os animais diabéticos (D) apresentaram valor significativamente maior em comparação com os grupos C, CT e DTP. O grupo DT não demonstrou alterações significantes em relação ao grupo D.

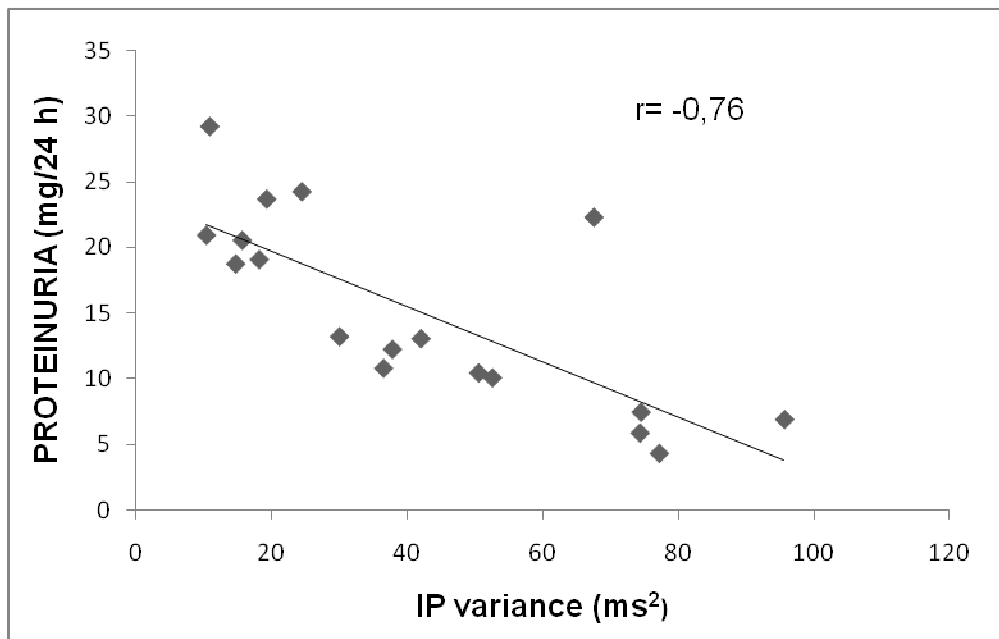
**Tabela 14:** Índice de função global do miocárdio dos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT) e diabético treinado (DT).

Variável/grupos	C	D	CT	DT	DTP
IFG	0,33 $\pm$ 0,02	0,46 $\pm$ 0,39*	0,32 $\pm$ 0,02#	0,39 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,01#

Valores representam média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$  vs. C; #  $p < 0,05$  vs. D. Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de uma via (ANOVA), seguido pelo *post hoc* de Student Newman Keuls.

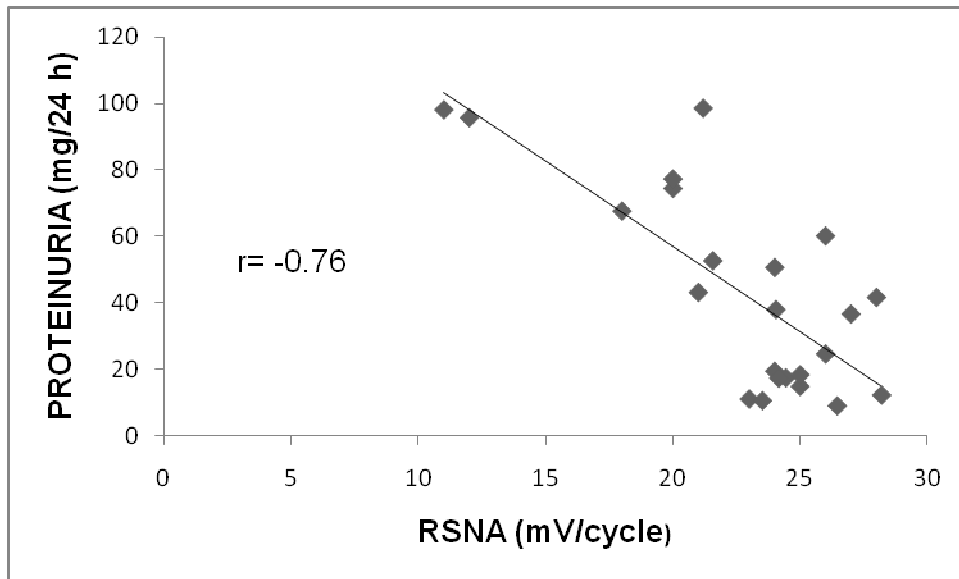
#### 4.1.10 Correlação

Encontramos correlação entre alguns dados estudados nesta pesquisa. A proteinúria (mg/24hr) apresentou correlação significativa com o VAR RR ( $\text{ms}^2$ ) e ANSR (mV/ciclo).



**Figura 12:** Correlação entre Proteinúria (mg/24hr) e variância do intervalos RR normais ( $\text{ms}^2$ ) nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado(DT) e diabático treinado prévio (DTP). O teste foi realizado pela Correlação de *Pearson*,  $r = -0,76$ .





**Figura 13:** Correlação entre Proteinúria (mg/24hr) e atividade nervosa simpática renal (mV/ciclo) nos grupos controle (C), diabético (D), controle treinado (CT), diabético treinado(DT) e diabético treinado prévio (DTP). O teste foi realizado pela Correlação de *Pearson*,  $r = -0,76$ .

## 5. DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo foram:

- a. A atenuação da perda de peso no grupo DT em comparação ao grupo D e aumento de peso no grupo DTP em comparação ao grupo D e DT.
- b. Diminuição da glicemia nos animais dos grupos DT e DTP.
- c. A velocidade máxima atingida ao final do protocolo foi maior no grupo DTP em comparação ao grupo DT e D.
- d. Com esse protocolo de TF, tanto realizado por 10 semanas quanto por 14 semanas, houve uma melhoria nos valores de creatinina sérica e do clearance de creatinina.
- e. Também ficou evidente a diminuição da proteinúria nos animais do grupo DT e DTP.
- f. Normalização dos valores de fração de excreção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , nos grupos DT e DTP.
- g. Os valores hemodinâmicos tenderam a normalizar com esse protocolo de treinamento no grupo DT e normalizaram no grupo DTP.
- h. A sensibilidade barorreflexa, sob análise do índice de TR estava menos prejudicada no grupo DT em comparação ao grupo D e normalizados no grupo DTP em comparação ao grupo DT e DTP.
- i. De forma geral a VFC estava aumentada nos animais do grupo CT, DT e DTP.
- j. A ANSR estava atenuada no grupo DT e DTP em comparação com o grupo D.
- k. Na avaliação ecocardiográfica encontramos melhora em alguns parâmetros analisados como a massa ventricular esquerda que estava com valores atenuados nos grupos DT e DTP em comparação aos animais do grupo D e a fração de ejeção que estava maior nos animais do grupo DTP.

Os dados encontrados no presente estudo corroboram com a literatura, sendo que o protocolo de treinamento físico utilizado neste estudo observou resultados interessantes ainda não relatados na literatura, principalmente pelo uso do treinamento físico prévio à indução do DM pela STZ.

O DM provoca alterações metabólicas e funcionais que diminuem a qualidade de vida dos portadores desta condição. A hiperglicemia, diminuição da capacidade física e alterações musculares são comuns nesta população (9, 18, 19, 22, 24, 94-96). Os estudos com modelos experimentais de diabetes têm sido utilizados na tentativa de esclarecimento dos principais mecanismos que modulam esta doença. O diabetes induzido por STZ é considerado um bom modelo de diabetes por provocar um estado metabólico muito semelhante ao diabetes humano. Alterações como: hiperglicemia, hipoinsulinemia, poliúria, perda de peso, proteinúria, albuminúria e diurese (9, 17). De fato, no presente estudo observamos que o grupo diabético (D) apresentou diminuição de peso corporal, hiperglicemia, proteinúria e poliúria em relação ao grupo C. Estudos anteriores já haviam demonstrado que animais diabéticos induzidos por STZ geralmente apresentam perda de peso corporal (64, 97).

Porém, nota-se que em relação ao peso corporal dos animais do grupo diabético treinado (DT) e dos animais do grupo diabético com treinamento prévio (DTP) houve uma atenuação na queda de peso corporal em relação ao grupo D. Estudos prévios têm demonstrado que animais diabéticos exercitados tendem a diminuir a perda de peso corporal (24, 64, 98, 99). Pesquisadores que utilizaram a natação como intervenção de treinamento físico em animais DM por STZ, observaram restauração do peso corporal nestes animais (100). Amatyakul e cols. (2006) utilizando a esteira para a prática de TF

demonstraram atenuação na perda de peso corporal em animais induzidos ao DM por STZ (101).

Os animais do grupo DTP apresentaram um leve ganho de peso em relação ao seu peso de indução. Portanto, este grupo previamente exercitado teve um ganho de peso de aproximadamente 8% em relação ao seu próprio peso de indução, já o grupo D apresentou uma redução de peso de aproximadamente 24%. Estudos têm demonstrado que o treinamento físico pode ser eficaz no controle metabólico, melhorando a sensibilidade a insulina e homeostase da glicose (24, 65, 102). Além disso, os efeitos do treinamento físico pode ser visto não somente em animais de experimentação como também em humanos. Eriksson e colaboradores (1998) demonstraram que o treinamento físico melhora a relação insulina/glicose em humanos com resistência à insulina. Outro estudo demonstrou que uma única sessão de exercício moderado alterou a sensibilidade à insulina em pacientes com diabetes tipo 2 (103). Estes efeitos tróficos podem ter colaborado para a atenuação da perda de peso no grupo DT e aumento de peso no grupo DTP, assim como, auxiliado na atenuação da hiperglicemia acometida nos grupos diabéticos treinados.

Os portadores de diabetes, assim como, os modelos experimentais de diabetes apresentam diminuição da capacidade física (90, 98, 99). Em nosso estudo os animais do grupo D demonstraram uma diminuição da capacidade física mensurada pela velocidade máxima atingida no final do teste de esforço, quando em comparação aos animais dos demais grupos estudados nesta pesquisa. Trabalhos anteriores que utilizaram o mesmo teste de esforço demonstraram resultados semelhantes (64, 98). Com relação aos animais do

grupo DT observou-se um aumento da capacidade física e um aumento mais pronunciado no grupo DTP. Sabe-se que o diabetes provoca alterações maléficas musculares e cardíacas que podem ter influenciado na capacidade física (8, 24). Além disso, alterações mitocondriais podem também modular esta variável (104, 105).

A nefropatia diabética pode acometer os portadores de DM. A hemodinâmica renal é caracterizada pela hiperfiltração glomerular e pelo aumento do fluxo sanguíneo renal, porém, não está bem estabelecido como o diabetes causa esta desordem hemodinâmica (30). Sabe-se, no entanto, que essas mudanças hemodinâmicas renais associadas à hiperglicemia induzem a produção de fatores de crescimento no glomérulo, dando início a significantes alterações morfológicas nestes componentes da filtração, resultando na hipertrofia glomerular (106). Em pessoas portadoras de DM e com hipertrofia de glomérulo, associada à hiperglicemia, pode ocorrer excreção de podócitos na urina juntamente com albumina, caracterizando a microalbuminúria e dependendo do nível de excreção desta variável podendo evoluir para macroproteinúria (107).

Em nosso estudo encontramos proteinúria nos animais do grupo D, de fato, estudos anteriores têm demonstrado que a presença de albuminúria progredindo para uma macroproteinúria é característica do descontrole glicêmico e tempo de duração do DM (108). Uma sessão aguda de exercício físico pode alterar a hemodinâmica renal. A alteração de fluxo sanguíneo para a musculatura ativa promove um aumento na pressão hidrostática glomerular, assim ocorre maior pressão das proteínas que passam pelo glomérulo no momento do exercício (109). Porém, o TF parece não prejudicar a função renal

em portadores de diabetes (71). Em nosso estudo encontramos atenuação dos valores de proteinúria nos grupos DT e DTP em comparação ao grupo D. Entretanto esse efeito benéfico do TF e do TF prévio sobre a excreção de proteínas ainda é controverso. Estudos têm demonstrado que o TF aumenta a excreção de albumina em portadores de diabetes (110), embora estudos também demonstrem efeitos benéficos do TF, principalmente quando associado à dieta (111). Nosso estudo observou claramente uma diminuição da proteinúria ao final do protocolo experimental sendo que as modificações autonômicas e simpáticas renais encontradas podem ter influenciado de maneira benéfica neste parâmetro (112).

A hiperfiltração glomerular apresenta como consequência uma sobrecarga na reabsorção tubular para evitar perda de água e eletrólitos (113). No presente estudo não encontramos diferença sobre os parâmetros de creatinina (sérica ou clearance de creatinina) entre os grupos controle C e CT, corroborando com estudo realizado por nosso grupo (114). O treinamento parece não alterar a taxa de filtração glomerular nem a excreção de albumina em pessoas normais (115). Já no grupo D observou-se aumento nos níveis de creatinina sérica e diminuição no clearance de creatinina. De fato, alguns trabalhos têm demonstrado que animais diabéticos por STZ têm seu clearance de creatinina diminuído, o que pode ser resultado da hiperfiltração glomerular ocorrida em neste modelo de diabetes (30, 116, 117).

Nos grupos treinados encontramos normalização dos parâmetros de creatinina sérica e do clearance de creatinina dos animais de grupo DT e DTP em relação ao grupo D. Tanto o treinamento físico realizado durante 10 semanas no grupo DT, como o treinamento físico prévio realizado pelo grupo

DTP, foram capaz de diminuir a creatinina sérica e o clearance de creatinina destes animais. Provavelmente pela melhora da nefropatia diabética e pela atenuação da neuropatia diabética mensurada pela atividade nervosa simpática renal.

O papel dos nervos renais na proteção da progressão da nefropatia diabética é controverso. Matsuoka em 1993 sugeriu que a desnervação simpática renal acelera o desenvolvimento da nefropatia no diabetes experimental. (118). Outro trabalho, demonstrou que o conteúdo de TGF- $\beta$ 1 e albumina urinária estavam aumentados, estes autores também sugerem que a desnervação renal aumenta a lesão renal (112, 119). Entretanto, outro trabalho demonstrou que a desnervação crônica previne a progressão da nefropatia diabética no início do diabetes, pela diminuição da hiperfiltração glomerular (120).

No presente estudo encontramos uma redução da ANSR nos animais do grupo D e uma elevada disfunção renal mensurada pelos altos valores de creatinina, proteinúria e excreção de sódio e potássio. De fato, Schaan e cols. em 2005, demonstraram que a diminuição da ANSR aumentou a diurese e natriurese de 24 horas em animais diabéticos por STZ, além disso, os mesmos autores demonstraram que a desnervação renal exacerbava os danos renais. Esses dados sugerem que a neuropatia que acomete os animais diabéticos tem um papel fundamental na progressão da nefropatia diabética. A desnervação renal parece provocar maiores danos ao rim, devido ao aumento descontrolado de fatores de crescimento como a citocina inflamatória TGF- $\beta$ 1 e da diminuição de transportadores de glicose como o GLUT2 (119).

O treinamento físico realizado pelos grupos DT e DTP, foi capaz de normalizar os dados de ANSR. Relacionando este resultado com os dados de função renal podemos verificar que a normalização da ANSR condiz com a normalização da função renal e com a atenuação da progressão da nefropatia diabética mensurada pela excreção de proteínas. Um trabalho demonstrou que a resposta simpato-inibitória provocada pela expansão de volume renal em animais com insuficiência cardíaca encontrava-se aumentada nos roedores que realizaram um programa de TF (121). Os benefícios do TF no rim são demonstrados também na população idosa, onde a função renal decresce com o avanço da idade. Observações sugerem que a realização de exercício vigoroso em idosos bem hidratados não alteram o padrão da taxa de filtração glomerular e excreção de albumina, que permaneceram dentro da normalidade (115).

As modificações vasculares que ocorrem no diabetes podem reduzir a responsividade dos vasos renais durante mudanças na pressão de perfusão renal. Desta maneira a redução deste mecanismo de controle da pressão arterial pode ter importante significado durante estados de hiper ou hipoperfusão, aumentando a vulnerabilidade para lesões isquêmicas do tecido renal e alterando o mecanismo renal de controle da pressão arterial.

Com a possibilidade de mensurar a pressão arterial batimento-a-batimento para as avaliações hemodinâmicas basais, no presente estudo, confirmou-se a redução da PA e da FC no grupo D quando comparado ao grupo C e CT. De fato, estudos anteriores têm demonstrado repetidamente queda de PA e da FC basais em ratos diabéticos em diferentes tempos de diabetes experimental, quando medidos diretamente da artéria (18, 22, 24, 59,



64, 98). Apesar de a literatura demonstrar valores elevados (122) e normalizados (123) de pressão arterial. É possível que alterações no débito cardíaco, produzidas pela queda da FC (efeito cronotrópico negativo), bem como pela redução da contratilidade ventricular (efeito inotrópico negativo) (24, 95), pudessem contribuir para redução da PA em animais diabéticos, uma vez que, a PA relaciona-se diretamente com o débito cardíaco, outro fator que pode contribuir para a queda desses valores é a diurese osmótica provocada pela hiperglicemia (9). Vale ressaltar que neste estudo os animais tiveram acesso livre à água e favorecendo a manutenção do volume extra-celular, apesar da bradicardia e hipotensão observados. Estudos anteriores utilizando o mesmo protocolo de treinamento físico aeróbio realizado com intensidade moderada e com um volume de treinamento diário realizado duas vezes ao dia, observou o papel importante na atenuação da queda de PA e FC característico de animais diabéticos por STZ que realizaram o treinamento. Este fato sugere que a função de marcapasso cardíaco mensurado pela frequência cardíaca intrínseca e aumento dos tônus simpático e vagal estejam melhoradas neste modelo (24, 64). No presente estudo, o grupo DT não demonstrou de forma significativa, mudanças nos valores de PA e FC, porém ficou evidenciado a atenuação na queda dos valores de PA. Além da possível melhora nos fatores simpáticos e vagais nestes animais, uma diminuição da razão glicose/insulina pode influenciar de forma benéfica no controle da PA nestes animais (68, 102). A FC dos animais diabéticos treinados não foi diferente dos animais diabéticos sedentários. Uma possível explicação para este fato é o volume de treinamento realizado pelos animais do grupo DT (uma vez ao dia).

O grupo DTP apresentou atenuação na queda dos valores de PA e FC quando comparados com os grupos D e DT, apesar dos valores de FC não serem significantes em comparação ao grupo D, esta variável demonstrou uma tendência a normalização. Sabe-se que o TF provoca alterações benéficas em humanos e animais de experimentação, tanto em fatores metabólicos quanto em fatores hemodinâmicos (64, 65), assim como a melhora da disfunção endotelial que geralmente acomete estes animais é atenuada com o treinamento físico (124), pode auxiliar nestas disfunções hemodinâmicas. O TF prévio realizado neste estudo por 4 semanas, pode ter elevado esses fatores, protegendo e exercendo efeitos benéficos nestas variáveis. Possivelmente melhoras na bradicardia e hipotensão sofrida por estes animais, bem como aumentando as reservas de GLUT4 no miocárdio que são diminuídas neste modelo, podem ter ocorrido com o TF prévio elevando ainda mais os benefícios da prática regular do exercício físico (125).

A disfunção autonômica que geralmente, acomete portadores e modelos experimentais de DM tem aumentado a morbidade e mortalidade nestas populações. A diminuição da VFC tem sido demonstrada por nossos estudos e outros pesquisadores e correlacionam com o aumento das disfunções cardíacas e renais (64, 95, 98, 126, 127). Dados da literatura têm demonstrado redução na sensibilidade barorreflexa, no tônus cardíaco vagal e na Var IP em animais diabéticos por STZ (2, 8, 64, 98, 128).

A sensibilidade do controle reflexo da frequência cardíaca desempenha um importante papel no controle momento a momento da PA. Este mecanismo de controle tem sido reconhecido como um importante preditor de risco após evento cardiovascular (126). Assim, portadores de DM com reflexos

cardiovasculares normais têm menor mortalidade quando comparados àqueles que apresentam algum tipo de prejuízo na função reflexa autonômica (129).

Nossos dados demonstram que os animais diabéticos (D) apresentaram tanto IBR reduzido em relação ao grupo C, quanto ITR reduzido em comparação com o mesmo grupo. Esses dados corroboram com estudos anteriores, onde animais com apenas 5 dias de indução ao diabetes por STZ, demonstraram prejuízo do controle barorreflexo, caracterizado pela redução da resposta taquicárdica, nesta fase da doença. Em 15 e 30 dias após administração de STZ, entretanto, observou-se também redução de bradicardia nesses animais (19), tais alterações desencadeadas pelo diabetes podem persistir em até 80 dias depois da administração de STZ (8, 130).

A intervenção realizada pelo treinamento físico aeróbio provoca atenuação das disfunções do prejuízo do barorreflexo que acomete portadores de DM. Neste estudo os animais que realizaram o treinamento físico por 10 semanas após a indução do DM, atenuaram as disfunções do barorreflexo (ITR) em relação aos animais do grupo D que apresentaram disfunção acentuada desta variável. Com relação ao IBR, os animais do grupo DT não apresentaram significância estatística, porém demonstraram uma tendência a valores normais deste índice em comparação ao grupo D. Estudos do nosso laboratório têm demonstrado que essa intervenção do TF provoca alterações benéficas na sensibilidade do barorreflexo (64, 98). É a primeira vez que um estudo promoveu a intervenção de um treinamento onde os animais foram treinados antes da indução ao DM por STZ. Neste estudo o grupo DTP, demonstrou aumento significativo da sensibilidade do barorreflexo em relação aos grupos D e DT. Possivelmente encontramos diferença significativa entre os

grupos treinados devido ao volume total de treinamento do grupo DTP. No entanto, vale ressaltar que o volume de TF durante o período pós-indução é o mesmo para os dois grupos (DT e DTP). Esse período de TF prévio pode ter aumentado a sensibilidade deste mecanismo de controle no grupo DTP. De fato, nossos animais do grupo CT aumentaram sua sensibilidade em 10 semanas de treinamento, estes dados assemelham-se aos dados do nosso laboratório (64).

Estudos têm evidenciado que a VFC e a VPA tem se tornado importantes ferramentas para o diagnóstico e prognóstico em muitas patologias, dentre elas o diabetes e a insuficiência cardíaca (36, 131). Em indivíduos diabéticos, a VFC, bem como as bandas de baixa (BF) e alta (AF) frequências, observadas pela análise espectral, pode preceder sintomas clínicos de disfunção autonômica (126). Estudos de nosso laboratório têm mostrado redução na sensibilidade barorreflexa, tônus cardíaco vagal e VFC em animais diabéticos por STZ (8, 128). Dessa forma, na literatura parece haver um consenso no que diz respeito à redução da VFC no diabetes, demonstrada tanto em humanos (131) como em ratos STZ (98, 128, 132, 133), sendo que esta redução pode estar associada à duração e a gravidade do diabetes. De fato, em nosso estudo observamos uma redução da VFC e da VPA no grupo diabético (D) avaliadas pela variância total. Provavelmente, essa redução possa ser explicada pela redução do tônus vagal e manutenção do tônus simpático observados neste modelo de diabetes (98). A redução da VFC nos animais diabéticos corrobora os achados de Fazan e cols. (1999), que demonstraram uma queda mais pronunciada da VFC nos animais diabéticos que possuem mais tempo da doença. Adicionalmente, os autores observaram

também uma queda da VPA somente nos animais diabéticos de 10 dias a 18 semanas de indução, não sendo observadas estas diferenças na fase aguda (5 dias) (132).

O treinamento físico de 10 semanas nos animais do grupo DT aumentou a variância dos intervalos RR assim como o RMSSD. Dados da literatura demonstram que essas variáveis são afetadas pelo TF de forma benéfica. Nosso estudo corrobora com estudos anteriores do nosso laboratório e de outros pesquisadores (64, 98, 134). O grupo DTP não obteve diferença significativa nessas variáveis em relação ao grupo DT, vale ressaltar que se observa uma tendência do grupo DTP em aumentar esta variável de forma mais acentuada que o grupo DT. O aumento do RMSSD foi demonstrado por Mostarda e cols. (2009a) nos animais diabéticos treinados por 10 semanas, porém, com um volume de treinamento maior que o utilizado neste estudo. Neste caso, parece que o volume de treinamento é importante quando relacionado com o tempo de diabetes. Pois, o volume total de TF no grupo DTP é maior, mas o TF realizado após a indução é igual para os dois grupos (DT e DTP).

Os portadores de DM que apresentam cardiomioplastia, geralmente demonstram anormalidades na morfometria e função cardíaca (135). A ecocardiografia tem se revelado uma ferramenta importante na avaliação cardíaca in vivo em diferentes circunstâncias. Muitos investigadores têm demonstrado anormalidades nas funções sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo em seres humanos (136) e ratos (137), usando esse método não invasivo de avaliação. Em animais, Joffe e colaboradores (138) observando a cardiomiopatia diabética, mostraram que ela se caracteriza por disfunção

sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, depois de dois meses e meio da injeção de STZ em ratos. Akula e colaboradores em 2003 observaram que as disfunções sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo foram totalmente visíveis em 12 semanas de diabetes pela avaliação com ecocardiograma, mostrando a utilidade deste método no diagnóstico de anormalidades cardíacas em ratos diabéticos, sem necessariamente do uso de procedimentos invasivos (137).

Em relação às avaliações da morfometria cardíaca, estudos anteriores evidenciaram que o diabetes experimental por STZ induz redução da espessura da parede dos ventrículos de ratos (95), o que corrobora com os nossos dados no presente estudo, onde demonstramos redução da massa ventricular esquerda e uma redução da IVSDIA nos animais diabéticos. Dados de nosso estudo, assim como de Wichi e colaboradores em 2007 demonstram que animais diabéticos por STZ apresentaram além das alterações estruturais, disfunções sistólica e diastólica.

No presente estudo o treinamento físico atenuou as alterações da massa ventricular esquerda sofrida pelos animais diabéticos. O grupo DTP atenuou de forma igual esta queda em comparação ao grupo DT, neste caso o TF prévio pareceu não interferir nas alterações provocadas pelo DM. Nossos dados corroboram com a literatura onde o TF atenuou as alterações morfométricas induzidas pelo diabetes, como o peso cardíaco que nestes animais tende a diminuir (139).

## **6. CONCLUSÃO**

O presente estudo indicou os efeitos benéficos do treinamento físico após a indução da doença e os efeitos de treinamento físico prescrito antes da indução da doença, com intuito de verificar se a prática regular de exercícios físicos poderia aumentar fatores considerados marcadores de função renal e cardiovascular.

Os resultados apresentados neste trabalho fornecem evidências de que o DM pode promover aumento na morbidade, pelas alterações renais e cardíacas induzidas pela STZ. Por outro lado o treinamento físico modula alterações benéficas, minimizando o impacto do DM nos sistemas cardiovascular e renal. Mais ainda, a realização do treinamento físico prévio mostrou-se eficaz na indução de maiores benefícios em alguns parâmetros analisado no presente estudo.

Estes resultados fortemente indicam que a escolha de um estilo de vida fisicamente ativa pode promover maiores benefícios à população. Adicionalmente, os achados do presente estudo oferecem uma oportunidade para melhor compreendermos as mudanças que ocorrem no mesmo indivíduo antes e após o estabelecimento do DM.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, *et al.* Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; **27**: 1047-1053.
2. De Angelis K, Irigoyen MC, Morris M. Diabetes and cardiovascular autonomic dysfunction: application of animal models. *Auton Neurosci* 2009; **145**: 3-10.
3. Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diabetes Care* 1992; **15**: 1509-1516.
4. Muir A, Schatz DA, Maclaren NK. The pathogenesis, prediction, and prevention of insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992; **21**: 199-219.
5. Gray A, Clarke P, Farmer A, Holman R. Implementing intensive control of blood glucose concentration and blood pressure in type 2 diabetes in England: cost analysis (UKPDS 63). *BMJ* 2002; **325**: 860.



6. Cersosimo E, DeFronzo RA. Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; **22**: 423-436.
7. Hadi HA, Suwaidi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag* 2007; **3**: 853-876.
8. De Angelis K, Schaan BD, Maeda CY, Dall'Ago P, *et al.* Cardiovascular control in experimental diabetes. *Braz J Med Biol Res* 2002; **35**: 1091-1100.
9. Vidotti DB, Arnoni CP, Maquigussa E, Boim MA. Effect of long-term type 1 diabetes on renal sodium and water transporters in rats. *Am J Nephrol* 2008; **28**: 107-114.
10. Dominiczak MH. Obesity, glucose intolerance and diabetes and their links to cardiovascular disease. Implications for laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med* 2003; **41**: 1266-1278.
11. Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature* 2001; **414**: 788-791.
12. Coskun O, Ocakci A, Bayraktaroglu T, Kanter M. Exercise training prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Tohoku J Exp Med* 2004; **203**: 145-154.

13. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005; **365**: 1333-1346.
14. Boden G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; **5**: 545-549.
15. Abdul-Ghani MA, Matsuda M, Jani R, Jenkinson CP, *et al.* The relationship between fasting hyperglycemia and insulin secretion in subjects with normal or impaired glucose tolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; **295**: E401-406.
16. Newham A, Ryan, R. . Prevalence of Diagnosed Diabetes Mellitus in General Practice in England and Wales, 1994 to 1998. *Health Statistics Quarterly* 2002; **14**: 5-13.
17. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969; **48**: 2129-2139.
18. Schaan BD, Maeda CY, Timm HB, Medeiros S, *et al.* Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in streptozotocin-induced diabetic rats treated with insulin. *Braz J Med Biol Res* 1997; **30**: 1081-1086.

19. Dall'Ago P, Fernandes TG, Machado UF, Bello AA, *et al.* Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 1997; **30**: 119-124.
20. Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, *et al.* Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967; **126**: 201-205.
21. Ilstrup KM, Keane WF, Michels LD. Intravascular and extracellular volumes in the diabetic rat. *Life Sci* 1981; **29**: 717-724.
22. Maeda CY, Fernandes TG, Lulhier F, Irigoyen MC. Streptozotocin diabetes modifies arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. *Braz J Med Biol Res* 1995; **28**: 497-501.
23. Maeda CY, Fernandes TG, Timm HB, Irigoyen MC. Autonomic dysfunction in short-term experimental diabetes. *Hypertension* 1995; **26**: 1100-1104.
24. De Angelis KL, Oliveira AR, Dall'Ago P, Peixoto LR, *et al.* Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 2000; **33**: 635-641.
25. Farah Vde M, De Angelis K, Joaquim LF, Candido GO, *et al.* Autonomic modulation of arterial pressure and heart rate variability in hypertensive diabetic rats. *Clinics (Sao Paulo)* 2007; **62**: 477-482.

26. Mostarda C, Wichi R, Sanches IC, Rodrigues B, *et al.* Hipertensão e modulação autonômica no idoso: papel do exercício físico. *Rev Bras Hipertens* 2009; **16**.
27. Mauer SM, Steffes MW, Azar S, Sandberg SK, *et al.* The effects of Goldblatt hypertension on development of the glomerular lesions of diabetes mellitus in the rat. *Diabetes* 1978; **27**: 738-744.
28. Mogensen CE, Andersen MJ. Increased kidney size and glomerular filtration rate in untreated juvenile diabetes: normalization by insulin-treatment. *Diabetologia* 1975; **11**: 221-224.
29. Steffes MW, Brown DM, Mauer SM. Diabetic glomerulopathy following unilateral nephrectomy in the rat. *Diabetes* 1978; **27**: 35-41.
30. Bell TD, DiBona GF, Wang Y, Brands MW. Mechanisms for renal blood flow control early in diabetes as revealed by chronic flow measurement and transfer function analysis. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 2184-2192.
31. Mauer SM, Michael AF, Fish AJ, Brown DM. Spontaneous immunoglobulin and complement deposition in glomeruli of diabetic rats. *Lab Invest* 1972; **27**: 488-494.

32. Gundersen HJ, Gotzsche O, Hirose K, Kroustrup JP, *et al.* Early structural changes in glomerular capillaries and their relationship to long-term diabetic nephropathy. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1981; **242**: 19-21.
33. Iseki K, Ikemiya Y, Iseki C, Takishita S. Proteinuria and the risk of developing end-stage renal disease. *Kidney Int* 2003; **63**: 1468-1474.
34. La Rovere MT, Bersano C, Gnemmi M, Specchia G, *et al.* Exercise-induced increase in baroreflex sensitivity predicts improved prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 2002; **106**: 945-949.
35. La Rovere MT, Bigger JT, Jr., Marcus FI, Mortara A, *et al.* Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet* 1998; **351**: 478-484.
36. La Rovere MT, Pinna GD, Raczak G. Baroreflex sensitivity: measurement and clinical implications. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2008; **13**: 191-207.
37. Pinna GD, Maestri R, Torunski A, Danilowicz-Szymanowicz L, *et al.* Heart rate variability measures: a fresh look at reliability. *Clin Sci (Lond)* 2007; **113**: 131-140.

38. DiCarlo SE, Collins HL, Rodenbaugh DW, Smitha MR, *et al.* Daily exercise reduces measures of heart rate and blood pressure variability in hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 2002; **24**: 221-234.
39. Parving HH. Diabetic nephropathy: prevention and treatment. *Kidney Int* 2001; **60**: 2041-2055.
40. O'Donnell MP, Kasiske BL, Keane WF. Glomerular hemodynamic and structural alterations in experimental diabetes mellitus. *FASEB J* 1988; **2**: 2339-2347.
41. Meeme A, Kasozi H. Effect of glycaemic control on glomerular filtration rate in diabetes mellitus patients. *Afr Health Sci* 2009; **9 Suppl 1**: S23-26.
42. Christiansen RE, Tenstad O, Leh S, Iversen BM. Glomerular charge selectivity is impaired in hypertensive nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2004; **19**: 1083-1091.
43. Patari A, Forsblom C, Havana M, Taipale H, *et al.* Nephrinuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; **52**: 2969-2974.
44. Steffes MW, Bilous RW, Sutherland DE, Mauer SM. Cell and matrix components of the glomerular mesangium in type I diabetes. *Diabetes* 1992; **41**: 679-684.

45. Fukui M, Nakamura T, Ebihara I, Shirato I, *et al.* ECM gene expression and its modulation by insulin in diabetic rats. *Diabetes* 1992; **41**: 1520-1527.
46. Thorn LM, Forsblom C, Fagerudd J, Thomas MC, *et al.* Metabolic syndrome in type 1 diabetes: association with diabetic nephropathy and glycemic control (the FinnDiane study). *Diabetes Care* 2005; **28**: 2019-2024.
47. Lee TM, Su SF, Tsai CH. Effect of pravastatin on proteinuria in patients with well-controlled hypertension. *Hypertension* 2002; **40**: 67-73.
48. Viberti G, Wheeldon NM. Microalbuminuria reduction with valsartan in patients with type 2 diabetes mellitus: a blood pressure-independent effect. *Circulation* 2002; **106**: 672-678.
49. Takahashi N, Anan F, Nakagawa M, Yufu K, *et al.* Microalbuminuria, cardiovascular autonomic dysfunction, and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2004; **53**: 1359-1364.
50. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, *et al.* Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2005; **67**: 2089-2100.

51. DiBona GF, Kopp UC. Neural control of renal function. *Physiol Rev* 1997; **77**: 75-197.
52. DiBona GF. Nervous kidney. Interaction between renal sympathetic nerves and the renin-angiotensin system in the control of renal function. *Hypertension* 2000; **36**: 1083-1088.
53. Chien CT, Chien HF, Cheng YJ, Chen CF, *et al.* Renal afferent signaling diuretic response is impaired in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int* 2000; **57**: 203-214.
54. Patel KP, Zhang PL. Reduced renal sympathoinhibition in response to acute volume expansion in diabetic rats. *Am J Physiol* 1994; **267**: R372-379.
55. Lohmeier TE. Interactions between angiotensin II and baroreflexes in long-term regulation of renal sympathetic nerve activity. *Circ Res* 2003; **92**: 1282-1284.
56. Vallon V, Blantz RC, Thomson S. Homeostatic efficiency of tubuloglomerular feedback is reduced in established diabetes mellitus in rats. *Am J Physiol* 1995; **269**: F876-883.



57. Hayashi K, Epstein M, Loutzenhiser R, Forster H. Impaired myogenic responsiveness of the afferent arteriole in streptozotocin-induced diabetic rats: role of eicosanoid derangements. *J Am Soc Nephrol* 1992; **2**: 1578-1586.
58. Christensen PK, Hansen HP, Parving HH. Impaired autoregulation of GFR in hypertensive non-insulin dependent diabetic patients. *Kidney Int* 1997; **52**: 1369-1374.
59. Dall'ago P, D'Agord Schaan B, da Silva VO, Werner J, *et al.* Parasympathetic dysfunction is associated with baroreflex and chemoreflex impairment in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Auton Neurosci* 2007; **131**: 28-35.
60. Weston PJ, Panerai RB, McCullough A, McNally PG, *et al.* Assessment of baroreceptor-cardiac reflex sensitivity using time domain analysis in patients with IDDM and the relation to left ventricular mass index. *Diabetologia* 1996; **39**: 1385-1391.
61. Maliszewska-Scislo M, Scislo TJ, Rossi NF. Effect of blockade of endogenous angiotensin II on baroreflex function in conscious diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; **284**: H1601-1611.

62. Zheng S, Noonan WT, Metreveli NS, Coventry S, *et al.* Development of late-stage diabetic nephropathy in OVE26 diabetic mice. *Diabetes* 2004; **53**: 3248-3257.
63. Basdevant A, Cassuto D, Gibault T, Raison J, *et al.* Microalbuminuria and body fat distribution in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1994; **18**: 806-811.
64. Mostarda C, Rogow A, Silva IC, De La Fuente RN, *et al.* Benefits of exercise training in diabetic rats persist after three weeks of detraining. *Auton Neurosci* 2009; **145**: 11-16.
65. Goodyear LJ, Kahn BB. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med* 1998; **49**: 235-261.
66. Association AD. Diabetes mellitus and exercise. *Diabetes Care* 2005; **25**: 564-568.
67. Medicine ACoS. Exercise and type 2 diabetes *Med Sci Sports Exerc* 2000.
68. De Angelis KL, Oliveira AR, Werner A, Bock P, *et al.* Exercise training in aging: hemodynamic, metabolic, and oxidative stress evaluations. *Hypertension* 1997; **30**: 767-771.

69. Irigoyen MC, Paulini J, Flores LJ, Flues K, *et al.* Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. *Hypertension* 2005; **46**: 998-1003.
70. Negrao CE, Middlekauff HR. Adaptations in autonomic function during exercise training in heart failure. *Heart Fail Rev* 2008; **13**: 51-60.
71. Poortmans JR, Vanderstraeten J. Kidney function during exercise in healthy and diseased humans. An update. *Sports Med* 1994; **18**: 419-437.
72. Patel DR, Torres AD, Greydanus DE. Kidneys and sports. *Adolesc Med Clin* 2005; **16**: 111-119, xi.
73. Patel DR, Raj VM, Torres A. Chronic kidney disease, exercise, and sports in children, adolescents, and adults. *Phys Sportsmed* 2009; **37**: 11-19.
74. Kohler M, Franz S, Regeniter A, Ikonen A, *et al.* Comparison of the urinary protein patterns of athletes by 2D-gel electrophoresis and mass spectrometry-a pilot study. *Drug Test Anal* 2009; **1**: 382-386.
75. Voss S, Ludke A, Romberg S, Schanzer E, *et al.* Effects of high intensity exercise on isoelectric profiles and SDS-PAGE mobility of erythropoietin. *Int J Sports Med* **31**: 367-371.

76. Poortmans JR, Labilloy D. The influence of work intensity on postexercise proteinuria. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1988; **57**: 260-263.
77. Robertshaw M, Cheung CK, Fairly I, Swaminathan R. Protein excretion after prolonged exercise. *Ann Clin Biochem* 1993; **30 ( Pt 1)**: 34-37.
78. Poortmans JR, Brauman H, Staroukine M, Verniory A, *et al.* Indirect evidence of glomerular/tubular mixed-type postexercise proteinuria in healthy humans. *Am J Physiol* 1988; **254**: F277-283.
79. Clerico A, Giammattei C, Cecchini L, Lucchetti A, *et al.* Exercise-induced proteinuria in well-trained athletes. *Clin Chem* 1990; **36**: 562-564.
80. Sigvardsson K, Svanfeldt E, Kilbom A. Role of the adrenergic nervous system in development of training-induced bradycardia. *Acta Physiol Scand* 1977; **101**: 481-488.
81. Castaneda C, Layne JE, Munoz-Orians L, Gordon PL, *et al.* A randomized controlled trial of resistance exercise training to improve glycemic control in older adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002; **25**: 2335-2341.

82. Dunstan DW, Daly RM, Owen N, Jolley D, *et al.* High-intensity resistance training improves glycemic control in older patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002; **25**: 1729-1736.
83. Peltoniemi P, Yki-Jarvinen H, Oikonen V, Oksanen A, *et al.* Resistance to exercise-induced increase in glucose uptake during hyperinsulinemia in insulin-resistant skeletal muscle of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2001; **50**: 1371-1377.
84. Ramires PR, Forjaz CL, Strunz CM, Silva ME, *et al.* Oral glucose ingestion increases endurance capacity in normal and diabetic (type I) humans. *J Appl Physiol* 1997; **83**: 608-614.
85. Fang ZY, Sharman J, Prins JB, Marwick TH. Determinants of exercise capacity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005; **28**: 1643-1648.
86. Rebelo MA, Bergamaschi, C.T., Ajzen, H., Schor, N. Avaliação da citratúria normal em ratos. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 1991; **13**: 135-142.
87. Henry R, Cannon, D., Winkelman, J. (ed). *Clinical Chemistry: Principles and Technics*. New York, 1974.

88. Owen JA, Iggo B, Scandrett FJ, Stewart CP. The determination of creatinine in plasma or serum, and in urine; a critical examination. *Biochem J* 1954; **58**: 426-437.
89. Brooks GA, White TP. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol* 1978; **45**: 1009-1015.
90. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, *et al.* Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 2007; **6**: 38.
91. Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev* 1970; **22**: 485-518.
92. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 1978; **58**: 1072-1083.
93. Ishise H, Asanoi H, Ishizaka S, *al. e.* Time course of sympathovagal imbalance and left ventricular dysfunction in conscious dogs with heart failure. *J Appl Physiol* 1998; **84**: 1234-1241.

94. De Angelis K, D'Agord Schaan B, Rodrigues B, Malfitano C, *et al.* [Cardiovascular autonomic dysfunction in experimental diabetes mellitus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007; **51**: 185-194.
95. Wichi R, Malfitano C, Rosa K, De Souza SB, *et al.* Noninvasive and invasive evaluation of cardiac dysfunction in experimental diabetes in rodents. *Cardiovasc Diabetol* 2007; **6**: 14.
96. Liu WJ, Jin HY, Park JH, Baek HS, *et al.* Effect of rimonabant, the cannabinoid CB1 receptor antagonist, on peripheral nerve in streptozotocin-induced diabetic rat. *Eur J Pharmacol* **637**: 70-76.
97. de Cavanagh EM, Ferder L, Toblli JE, Piotrkowski B, *et al.* Renal mitochondrial impairment is attenuated by AT1 blockade in experimental Type I diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; **294**: H456-465.
98. Souza SB, Flues K, Paulini J, Mostarda C, *et al.* Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. *Hypertension* 2007; **50**: 786-791.
99. Sanchez OA, Snow LM, Lowe DA, Serfass RC, *et al.* Effects of endurance exercise-training on single-fiber contractile properties of insulin-treated streptozotocin-induced diabetic rats. *J Appl Physiol* 2005; **99**: 472-478.

100. Selagzi H, Buyukakilli B, Cimen B, Yilmaz N, *et al.* Protective and therapeutic effects of swimming exercise training on diabetic peripheral neuropathy of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol Invest* 2008; **31**: 971-978.
101. Amatyakul S, Chakraphan D, Chotipaibulpan S, Patumraj S. Role of exercise training on pulpal blood flow in diabetic rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006; **34**: 295-301.
102. De Angelis Lobo d'Avila K, Gadonski G, Fang J, Dall'Ago P, *et al.* Exercise reverses peripheral insulin resistance in trained L-NAME-hypertensive rats. *Hypertension* 1999; **34**: 768-772.
103. Oguri M. Self-calibrated cluster counts as a probe of primordial non-Gaussianity. *Phys Rev Lett* 2009; **102**: 211301.
104. Rouyer O, Zoll J, Daussin F, Damge C, *et al.* Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on skeletal muscle oxidative function and exercise capacity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Physiol* 2007; **92**: 1047-1056.
105. el Midaoui A, Tancrede G, Nadeau A. Effect of physical training on mitochondrial function in skeletal muscle of normal and diabetic rats. *Metabolism* 1996; **45**: 810-816.



106. Wolf G. Molecular mechanisms of diabetic mesangial cell hypertrophy: a proliferation of novel factors. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 2611-2613.
107. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, *et al.* Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000; **15**: 1379-1383.
108. Rasch R. Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment. Albumin excretion. *Diabetologia* 1980; **18**: 413-416.
109. Bergamaschi CT, Boim MA, Moura LA, Picarro IC, *et al.* Effects of long-term training on the progression of chronic renal failure in rats. *Med Sci Sports Exerc* 1997; **29**: 169-174.
110. Christensen CK. Abnormal albuminuria and blood pressure rise in incipient diabetic nephropathy induced by exercise. *Kidney Int* 1984; **25**: 819-823.
111. Loupal G, Url A, Skalicky M, Viidik A. Physical exercise retards the development of chronic nephropathy in the ageing rat as efficiently as food restriction does. *Gerontology* 2005; **51**: 83-93.

112. Schaan BD, Irigoyen MC, Lacchini S, Moreira ED, *et al.* Sympathetic modulation of the renal glucose transporter GLUT2 in diabetic rats. *Auton Neurosci* 2005; **117**: 54-61.
113. Thomas MC, Burns WC, Cooper ME. Tubular changes in early diabetic nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis* 2005; **12**: 177-186.
114. Abreu NP, Bergamaschi CT, di Marco GS, Razvickas CV, *et al.* Effect of an isotonic rehydration sports drink and exercise on urolithiasis in rats. *Braz J Med Biol Res* 2005; **38**: 577-582.
115. Poortmans JR, Ouchinsky M. Glomerular filtration rate and albumin excretion after maximal exercise in aging sedentary and active men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006; **61**: 1181-1185.
116. Vaishya R, Singh J, Lal H. Biochemical effects of irbesartan in experimental diabetic nephropathy. *Indian J Pharmacol* 2009; **41**: 252-254.
117. Li X, Cui X, Sun X, Zhu Q, *et al.* Mangiferin prevents diabetic nephropathy progression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res* **24**: 893-899.
118. Matsuoka H. Protective role of renal nerves in the development of diabetic nephropathy. *Diabetes Res* 1993; **23**: 19-29.

119. Schaan BD, Irigoyen MC, Bertoluci MC, Lima NG, *et al.* Increased urinary TGF-beta1 and cortical renal GLUT1 and GLUT2 levels: additive effects of hypertension and diabetes. *Nephron Physiol* 2005; **100**: p43-50.
120. Luippold G, Beilharz M, Muhlbauer B. Chronic renal denervation prevents glomerular hyperfiltration in diabetic rats. *Nephrol Dial Transplant* 2004; **19**: 342-347.
121. Zheng H, Li YF, Zucker IH, Patel KP. Exercise training improves renal excretory responses to acute volume expansion in rats with heart failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; **291**: F1148-1156.
122. Katayama S, Lee JB. Hypertension in experimental diabetes mellitus. Renin-prostaglandin interaction. *Hypertension* 1985; **7**: 554-561.
123. Hicks KK, Seifen E, Stimers JR, Kennedy RH. Diabetes with and without ketoacidosis on right atrial pacemaker rate and autonomic responsiveness. *Am J Physiol* 1997; **273**: H1888-1893.
124. Chakraphan D, Sridulyakul P, Thipakorn B, Bunnag S, *et al.* Attenuation of endothelial dysfunction by exercise training in STZ-induced diabetic rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2005; **32**: 217-226.

125. Hall JL, Sexton WL, Stanley WC. Exercise training attenuates the reduction in myocardial GLUT-4 in diabetic rats. *J Appl Physiol* 1995; **78**: 76-81.
126. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation* 1996; **93**: 1043-1065.
127. Galicka-Latala D, Konduracka E, Kuzniewski M, Fedak D, *et al.* [Myocardial dysfunction, neuropathy and nephropathy in long standing type 1 diabetic patients]. *Przegl Lek* 2005; **62**: 1451-1454.
128. Schaan BD, Dall'Ago P, Maeda CY, Ferlin E, *et al.* Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Braz J Med Biol Res* 2004; **37**: 1895-1902.
129. Ewing DJ, Campbell IW, Clarke BF. The natural history of diabetic autonomic neuropathy. *Q J Med* 1980; **49**: 95-108.
130. Harthmann AD, De Angelis K, Costa LP, Senador D, *et al.* Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats. *Auton Neurosci* 2007; **133**: 115-120.

131. Gottsater A, Ahlgren AR, Taimour S, Sundkvist G. Decreased heart rate variability may predict the progression of carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. *Clin Auton Res* 2006; **16**: 228-234.
132. Fazan R, Jr., Ballejo G, Salgado MC, Moraes MF, *et al.* Heart rate variability and baroreceptor function in chronic diabetic rats. *Hypertension* 1997; **30**: 632-635.
133. Fazan R, Jr., Dias da Silva VJ, Ballejo G, Salgado HC. Power spectra of arterial pressure and heart rate in streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Hypertens* 1999; **17**: 489-495.
134. Pagkalos M, Koutlianos N, Kouidi E, Pagkalos E, *et al.* Heart rate variability modifications following exercise training in type 2 diabetic patients with definite cardiac autonomic neuropathy. *Br J Sports Med* 2008; **42**: 47-54.
135. Ahmed SS, Jaferi GA, Narang RM, Regan TJ. Preclinical abnormality of left ventricular function in diabetes mellitus. *Am Heart J* 1975; **89**: 153-158.
136. Di Bonito P, Cuomo S, Moio N, Sibilio G, *et al.* Diastolic dysfunction in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus of short duration. *Diabet Med* 1996; **13**: 321-324.

137. Akula A, Kota MK, Gopisetty SG, Chitrapu RV, *et al.* Biochemical, histological and echocardiographic changes during experimental cardiomyopathy in STZ-induced diabetic rats. *Pharmacol Res* 2003; **48**: 429-435.
138. Joffe, II, Travers KE, Perreault-Micale CL, Hampton T, *et al.* Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetic rat: noninvasive assessment with doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway. *J Am Coll Cardiol* 1999; **34**: 2111-2119.
139. Korte FS, Mokolke EA, Sturek M, McDonald KS. Exercise improves impaired ventricular function and alterations of cardiac myofibrillar proteins in diabetic dyslipidemic pigs. *J Appl Physiol* 2005; **98**: 461-467.

## **ANEXO: ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO**

Role of previous exercise training on diabetic nephropathy and cardiovascular autonomic dysfunction in experimental diabetes, in rats.

Kleitton Augusto dos Santos Silva<sup>1,2</sup>, Rafael da Silva Luiz<sup>1</sup>, Rodolfo Rosseto Rampaso<sup>1</sup>, Nayda Parísio de Abreu<sup>1</sup>, Georgia Orsi Candido<sup>2</sup>, Édson Dias Moreira<sup>2</sup>, Cristiano Teixeira Mostarda<sup>1,2</sup>, Kátia De Angelis<sup>3</sup>, Maria Cláudia Irigoyen<sup>2</sup>, Nestor Schor<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Nephrology Division, Department of Medicine, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil;

<sup>2</sup> Hypertension Unit, Heart Institute (InCor), Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil;

<sup>3</sup> Nove de Julho University, São Paulo, Brazil.

Corresponding author:

Nestor Schor, MD, PhD

Nephrology Division, Department of Medicine, Federal University of São Paulo (UNIFESP)

Rua Botucatu 740 São Paulo, SP, Brazil, Zip Code: 04023-900

Phone: +55 11 59041699

Fax: +55 11 59041684

E-mail: nestor@nefro.epm.br

## **Abstract**

Exercise training (ET) is an important intervention for chronic diseases such as diabetes mellitus (DM). However, it is not known whether previous ET intervention alters the physiological and medical outcomes of these diseases. We investigated the effects of previous ET on diabetic nephropathy and cardiovascular autonomic control in rats with DM. Male Wistar rats were divided in five groups: control (C), diabetic (D), trained control (TC), trained diabetic (TD) and previous trained diabetic (PTD). TC and TD underwent 10 wks of ET, and PTD underwent 14 wks of ET. Renal function, proteinuria, RSNA and autonomic modulation and baroreflex sensitivity (BRS) were evaluated. Previous ET was found to reduce proteinuria in the PTD group ( $36.9 \pm 10.2$  mg/24 h) compared to the D group ( $90.6 \pm 5.7$  mg/24 h,  $p < 0.05$ ), and to attenuate proteinuria in the PTD group with respect to the TD group. Furthermore, the fractional excretion of sodium was reduced in the PTD group ( $0.72 \pm 0.06$  %) compared to the D group ( $2.40 \pm 0.30$  %,  $p < 0.05$ ) and in relation to the TD group. Moreover, previous ET was observed to normalize RSNA in PTD rats compared to rats in the D group ( $23.6 \pm 0.6$  mV/cycle vs.  $18.1 \pm 1.7$  mV/cycle, respectively;  $p < 0.05$ ) in addition to improving both heart rate variability and BRS. This study demonstrates that previous ET may improve the damage that affects DM. Additionally, these findings suggest that development of diabetic nephropathy as well as autonomic dysfunction can be minimized by four weeks of ET before induction of DM by streptozotocin in rats.

**Key words:** Previous exercise training, progression of renal disease, baroreflex sensitivity, streptozotocin, heart rate variability.



## **Background**

Diabetes mellitus (DM) has become an epidemic disease characterized by metabolic abnormalities and associated cardiovascular and kidney complications. Obesity and a sedentary lifestyle contribute to an increased morbidity and mortality in patients with DM (37).

Patients with DM are at an increased risk for cardiovascular disease and frequently become hemodialysis-dependent secondary- to end-stage renal disease (ESRD). Persistent hyperglycemia as seen in DM may damage the kidney and is characterized by glomerular hyperfiltration and hypertension, osmotic diuresis and proteinuria (1). The renal nerves are thought to play an important role in the development of hypertension (19). In streptozotocin (STZ)-induced DM, renal nerves may differentially modulate renal glucose transporters such as GLUT 1 and GLUT 2 (28). Furthermore, renal autoregulation by afferent arterioles may be impaired in animals in this experimental model, increasing urinary albumin as early as two weeks (2). Autonomic neuropathy is present in many patients with DM, and it has been shown that this dysregulation causes a decrease in heart rate variability (HRV) and an increase in morbidity and mortality (18).

Exercise training (ET) appears to be an adjuvant tool in protecting against chronic diseases such as DM, ESRD and heart failure (17, 30, 34). When ET is performed, it attenuates the complications observed in diabetic animals as well as humans (14, 16, 23, 26). Studies from our laboratory have demonstrated that benefits of ET could be present despite hyperglycemia and animals with STZ-induced DM have shown improved physical capacity (23, 32). Autonomic responses in animals and humans who participated in a physical

training program are well described in the literature (9, 24, 25, 33, 36). Increases in high frequency component of HRV demonstrated the beneficial effects of ET in patients with DM (23). In diabetic patients with kidney disease, aerobic training may improve both physical functioning and quality of life (5, 17).

Despite extensive evidence in the literature demonstrating the benefits of moderate exercise on the morphological and functional outcomes of several diseases, there is little knowledge about the effects of early ET in experimental models. Furthermore, this is the first study in which a protocol of moderate aerobic previous ET is tested in experimental models of DM-induced by STZ, measuring evolution the diabetic nephropathy and autonomic dysfunction.

The aim of this study was to evaluate the effects of 14 weeks of exercise training on cardiovascular and renal complications caused by experimental DM, where the first four weeks occurred without the presence of DM, featuring a previous ET.

## **Methods**

### **Animals**

All experimental procedures were conducted according to the National Institutes of Health Guidelines for the use and care of animals. The study protocol was approved by the Ethics in Research Committee of the Federal University of São Paulo (UNIFESP) (process N<sup>o</sup> 0878/08).

Experiments were performed using male Wistar rats (150 to 180 g) provided by the animal house of UNIFESP. The animals were housed in individual cages in a temperature-controlled room (22 °C) with a 12 h dark-light cycles. The animals were randomly assigned to one of five groups: control (C,

n=8), sedentary diabetic (D, n=8), trained control (TC, n=8), trained diabetic (TD, n=8) and previous trained diabetic (PTD, n=8).

### **Diabetes mellitus induction**

DM was induced using a single injection of STZ (50 mg/kg, i.v.; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) dissolved in citrate buffer, pH 4.5, after 6 h of fasting. Blood samples (50 µl) were collected to measure blood glucose 72 h after STZ injection and at the end of the protocol (Advantage – Roche Laboratories, São Paulo, São Paulo, Brazil). No insulin was given to the animals.

### **Maximal running test and exercise training**

Functional capacity was measured using the maximal exercise test as described in the literature (27). In summary, all rats were submitted to an adaptation period on the treadmill (Inbramed, Brazil) at a speed of 0.3 km/h for 10 minutes five days per week. The maximal exercise test was then performed individually at an initial speed of 0.3 km/h with increments of 0.3 km/h every 3 minutes.

After completion of the maximal running test, the training program was expanded to include a moderate intensity session (40–60 % maximal running test) five days per week, building up to one hour per day toward the end of the protocol. The PTD group performed ET over 14 weeks. The first four weeks of training were conducted prior to induction of DM, and this protocol was characterized as “previous ET”. After induction of DM, this group received exercise training for an additional 10 weeks. All other groups were followed for 14 weeks, and ET in the diabetic trained group and control trained group occurred only at the end of the fourth week. All animals were adapted to the

procedure (10 min/day; 0.3 km/h) for one week prior to initiating the exercise training protocol, and this adaptation period began 24 h after DM induction. Sedentary and trained groups underwent a maximal treadmill test as described in detail elsewhere (4, 27).

### **Renal Function**

For urine collection, rats were placed in metabolic cages for 24 h at the beginning and end of the protocol period. Parameters analyzed included urinary creatinine, proteinuria, sodium and potassium. Plasma was also collected at the beginning and end of the protocol period to determine serum creatinine, sodium and potassium levels. To be certain that urine was not contaminated with bacteria, urine samples were collected and cultured from all animals under aseptic conditions. For the evaluation of renal function and proteinuria were used a Semi-automatic biochemical analyzer, model BIO-200F, São Paulo, São Paulo, Brazil and for to verify creatinine levels it was used Jaffé method (Creatinina K – Colorimétrico, Picrato alcalino, Labtest Diagnóstica SA, Minas Gerais, Brazil) and for urinary protein excretion a Sensiprot Protein Assay Kit (Labtest Diagnóstica SA, Minas Gerais, Brazil) was employed. Creatinine clearance was calculated using the formula  $UV/P$ , where U is the creatinine concentration in urine, V is the 24 h urinary volume, and P is the plasma creatinine concentration. The sodium and potassium excretion rate was also calculated using traditional formulas. The final samples were collected at least 24 h after the last exercise session.

### **Cardiovascular assessment**

After urine collection, 2 catheters with 0.06 mL saline each were implanted into the femoral artery and vein (PE-10) while the animals were

anesthetized (ketamine 80 mg/kg + xylazine 12 mg/kg, IP) for direct measurement of arterial pressure (AP) and drug administration, respectively. Rats received food and water ad libitum and were studied 48 h after catheter placement; the rats were conscious in their cages and allowed to move freely during the experiments. The arterial cannula was connected to a strain-gauge transducer (P23Db, Gould-Statham, Oxnard, CA), and AP signals were recorded over a 30 min period using a microcomputer equipped with an analog-to-digital converter board (CODAS, 2 kHz sampling frequency, Dataq Instruments, Inc., Akron, OH). The recorded data were analyzed on a beat-to-beat basis to quantify changes in mean AP and heart rate (HR) (15). HRV was determined using the standard deviation of the basal HR during the recording period. Sequential increasing bolus injections (0.1 mL) of phenylephrine (0.25 to 32  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and sodium nitroprusside (0.05 to 1.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) were given to induce a minimum of 4 pressure responses (for each drug) ranging from 5 to 40 mmHg. A 3–5 min interval between doses was necessary to allow the AP to return to baseline. Peak increases or decreases in mean AP after phenylephrine or sodium nitroprusside injection as well as the corresponding peak reflex changes in HR were recorded for each medication dosing. The baroreflex sensitivity (BRS) was evaluated using mean index, which was calculated as the ratio between changes in HR and changes in mean AP, thus allowing for separate analyses of bradycardic and tachycardic responses. The mean index was expressed as bpm/mmHg, as described elsewhere (6, 32).

### **Heart rate and blood pressure variability**

Time-domain analyses consisted of calculating the mean pulse interval (PI), systolic AP, PI variability and systolic AP variability as the PI variance from

the respective time series. We also calculated the root mean square of successive PI (RMSSD) index differences, which is a representative index of vagal modulation.

For frequency domain analyses, the entire 20 min time series of PI and systolic AP were cubic-spline interpolated (250 Hz) and decimated in order to be equally spaced in time. Following linear trend removal, the power spectral density was obtained by the Fast Fourier Transformation using the Welch's method over 16,384 points with a Hanning window (512) and 50 % overlap. The spectral power for low- (LF 0.20–0.75 Hz) and high- (HF 0.75–3.0 Hz) frequency bands was calculated using means of power spectrum density integration within each frequency bandwidth via a customized program (MATLAB 6.0, Mathworks). Considering that the proportional contribution of the very low frequency component may increase in 20 min recordings in freely moving animals, data were submitted to another processing program, where the 20 min recordings of the decimated PI signal (2048 points) were segmented into 2.5 min periods, and only steady segments were processed as described above.

The spectral power within the low frequency and high frequency component bands in each animal across the 20 min recordings was averaged over 2.5 min segments and used for analyses (31).

### **Renal sympathetic nerve activity**

After cardiovascular assessment, at the same day, rats were anesthetized (Pentobarbital sodium, 40 mg/kg) and a thin bipolar platinum electrode was placed around a branch of the left renal nerve and insulated with silicone rubber (Wacker Sil-Gel 604). During the experiment, rats were kept

anesthetized (30 min) and each rat remained in the same cage used to cardiovascular assessments (25 x 15 x 10-cm Plexiglas cages with a grid floor). The signal from the nerve electrode was recorded after being amplified (Tektronix 5A22N differential amplifier) and filtered (band pass filter, 100 Hz to 2 kHz). The original neurogram was monitored with a storage oscilloscope (Tektronix 5111) and stored on a tape recorder (Hewlett Packard, model 7754A) during a control period of 3 min. Further processing was performed using a data-acquisition system assembled on a personal microcomputer equipped with an analog-to-digital converter (CODAS, 10 kHz sampling frequency, Dataq Instruments). To compare different groups of rats, RSNA values were expressed as a percentage of the maximal (100%) and minimal (0%) nerve activity during 1,000 cardiac cycles, as described elsewhere (21). Normalization was performed to account for the varying intensities of recorded signal, which is consistent with the recording instrument's multifiber nature. Briefly, the maximal and minimal values of nerve activity (100 and 0%) were determined from the 3% of recorded cardiac cycles that showed the highest and the lowest activity levels.

### **Statistical analyses**

The results are presented as mean  $\pm$  SEM, and ANOVA (one-way) was used to compare between groups, followed by the Student Newman-Keuls test. The Pearson correlation was used to study the association between variables. The significance level was established as  $p < 0.05$ .

## Results

### Body weight (BW), blood glucose and physical capacity

The diabetic trained groups demonstrated an increase in final BW ( $282\pm 11$  g) when compared to the sedentary diabetic group ( $233\pm 6$  g,  $p<0.05$ ). Interestingly, the PTD group showed an increase in final BW in relation to the TD group ( $343\pm 18$  vs.  $282\pm 11$  g,  $p<0.05$ ).

After induction by STZ, all diabetic groups showed high blood glucose, however, only TD and DTP groups demonstrated attenuation in high blood glucose at the end of the protocol. Group D presented with higher blood glucose ( $497\pm 19$  mg/dL) compared to the TD group ( $379\pm 20$  mg/dL,  $p<0.05$ ) and PTD group ( $365\pm 19$  mg/dL,  $p<0.05$ ).

At the end of the 4<sup>th</sup> week of training, the PTD group had increased their physical capacity ( $1.90\pm 0.10$  km/h,  $p<0.05$ ) secondary to previous ET as compared to all other groups at the same time point. At the end of the experiment protocol, the trained groups had increased their physical capacity (TC:  $2.40\pm 0.10$  km/h; TD:  $1.80\pm 0.07$  km/h; PTD:  $2.30\pm 0.09$  km/h). Specifically, the PTD group had increased their physical capacity when compared to the TD group ( $2.30\pm 0.09$  km/h vs.  $1.80\pm 0.07$  km/h, respectively,  $p<0.05$ ), as shown in Table 1.

### Renal function

The Table 2 shows the values for excretion of urinary creatinine, proteinuria and sodium and potassium. The presence of DM increased the levels of all urinary parameters analyzed in D group compared to the rest of the groups. ET and previous ET normalized creatinine clearance in the TD ( $1.79\pm 0.37$  ml/min) and PTD groups ( $1.70\pm 0.24$  ml/min) compared to the D



group ( $0.65\pm 0.11$  ml/min,  $p<0.05$ ). Previous ET group decreased urinary protein excretion when compared to the D group ( $36.9\pm 10.2$  mg/24 h vs.  $90.6\pm 5.7$  mg/24 h, respectively,  $p<0.05$ ).

The fractional excretion of sodium and potassium was determined to be decreased in the TD and PTD groups in comparison to group D, with Na:  $0.99\pm 0.02$  % and  $0.72\pm 0.06$  % vs.  $2.40\pm 0.30$  %, respectively ( $p<0.05$ ) and K:  $3.20\pm 0.54$  % and  $2.90\pm 0.90$  % vs.  $6.80\pm 1.20$  %, respectively ( $p<0.05$ ). There was no difference between the trained diabetic groups with respect to the excretion of these ions.

### **Hemodynamic and autonomic function evaluation**

At the end of the experimental protocol, hemodynamic evaluations were performed and the mean AP (MAP), systolic AP (SAP), diastolic AP (DAP) and HR was recorded as shown in Table 3. The D group demonstrated a reduction in AP and HR values in comparison to the PTD group ( $p<0.05$ ). Previous ET normalized the SAP ( $126\pm 5$  mmHg,  $p<0.05$ ) and HR ( $300\pm 6$  bpm,  $p<0.05$ ); however, the TD group did not recover decreases in these variables with PT (SAP:  $112\pm 3$  mmHg,  $p<0.05$ ; HR:  $270\pm 5$  bpm,  $p<0.05$ ).

Results from HRV and BPV measurements are summarized in Table 3. We found that the PI variance ( $41\pm 2$  ms<sup>2</sup>,  $p<0.05$ ) and SAP variance ( $6\pm 0.44$  mmHg<sup>2</sup>,  $p<0.05$ ) were lower in the diabetic groups compared to all other groups. Moreover, the PTD group had improved PI variance relative to the D group ( $93\pm 7$  ms<sup>2</sup> vs.  $41\pm 2$  ms<sup>2</sup>,  $p<0.05$ ). There was no difference between the PTD and TC groups in this variable. The RMSSD index was increased in the TD ( $11.50\pm 1.80$  ms) and PTD groups ( $11.20\pm 0.20$  ms) compared to all other groups ( $p<0.05$ ), but ET did not alter the RMSSD index in the TC group relative to

group C ( $7.52\pm 0.51$  vs.  $6.15\pm 0.50$  ms). Exercise training did normalize the LF and HF bands of HRV in the TD and PTD groups when compared to the D group.

We observed a significant decrease in BRS in the D group, as shown in Figure 1. Tachycardic (TR) ( $1.83\pm 0.32$  bpm/mmHg,  $p<0.05$ ) and bradycardic (BR) ( $-0.93\pm 0.31$  bpm/mmHg,  $p<0.05$ ) responses were lower in group D compared to the PTD group, which demonstrated TR  $3.67\pm 0.60$  mmHg,  $p<0.05$ , and BR  $-2.50\pm 0.20$  bpm/mmHg,  $p<0.05$ . However, only the TR parameter showed an increase in the TD group relative to the D group ( $2.70\pm 0.35$  bpm/mmHg vs.  $1.83\pm 0.32$  bpm/mmHg, respectively,  $p<0.05$ ). ET increased the tachycardic and bradycardic responses in the TC group.

### **Renal sympathetic nerve activity**

The diabetic group demonstrated a decrease in the activity of renal nerves in comparison to all other groups ( $18.1\pm 1.69$  mV/cycle,  $p<0.05$ ) as showed in Figure 2. Both ET ( $24.8\pm 2.50$  mV/cycle,  $p<0.05$ ) and previous ET ( $23.6\pm 0.60$  mV/cycle,  $p<0.05$ ) in the diabetic groups resulted in improved RSNA compared to the D group. These groups demonstrated normal values with respect to the TC group.

### **Correlations**

In addition to the abovementioned data, we observed inverse relationships between proteinuria and PI variance ( $r= -0.76$ , Figure 3B). Furthermore, we demonstrated that proteinuria is also inversely related to RSNA ( $r= -0.76$ , Figure 3A).

## Discussion

The primary finding from this study was that previous ET, performed prior to the induction of DM by streptozotocin, in rats, minimized the deleterious effects of DM in the development of diabetic nephropathy and cardiovascular autonomic dysfunction despite the presence of high blood glucose levels by the end of the exercise training protocol. Furthermore, this is the first study where a previous aerobic ET performed by four weeks is applied in this experimental model of diabetes.

Additionally, the present study also demonstrated the beneficial effects of exercise training after induction of DM. In addition, we investigated how previous ET modulates STZ-induced DM by examining creatinine and protein excretion and fractional excretion of sodium and potassium. Furthermore, we analyzed RSNA and the cardiac autonomic function. Our experimental data suggest animals demonstrated decreased BW and physical capacity and increased blood glucose with the evolution of DM, as expected. ET was shown to attenuate hyperglycemia and weight loss and increase physical capacity, which are observations that have also been demonstrated by other researchers (23, 32).

Importantly, previous ET showed an improvement in DM parameters. The PTD group showed an increase in physical capacity of approximately 130% in comparison to the D group, and 27% in comparison to the TD group. These data suggest that four weeks of exercise training prior to the onset of DM may potentially increase the beneficial on the physical parameters. In fact, in 1996, el Midaoui and colleagues demonstrated that despite of hyperglycemia, 10 weeks of aerobic ET increased the capacity of skeletal muscle mitochondria to

oxidize substrate and to generate ATP in both control trained and diabetes trained animals (11). DTP group that was previously exercised had a weight gain of about 8% in relation to the weight induction, since the D group showed a weight reduction of approximately 24%. Studies have shown that ET can be effective in metabolic control by improving insulin sensitivity and glucose homeostasis (7, 8, 14). In the present study, PTD group demonstrated a capacity of attenuates hyperglycemia in comparison to D group, this fact may shown ameliorates the metabolic changes (despite the high glucose levels and absence of insulin) in these animals and the outcomes at the end of the protocol may reflect previous ET.

Renal function was demonstrated to be altered in the D group as observed by changes in creatinine clearance and fractional excretion of sodium and potassium, as well as the development of diabetic nephropathy (see Table 2). Changes in renal hemodynamics is present in DM, as characterized by increased renal blood flow and hyperfiltration (2). It is believed that these renal hemodynamic changes are a result of hyperglycemia, which induces growth factor production in glomeruli and drives morphological changes such as glomerular hypertrophy, thus affecting glomerular filtration (35). Individuals with diabetes and glomerular hypertrophy secondary to hyperglycemia may excrete podocytes and albumin into the urine, which is a feature of microalbuminuria and may potentially progress to macroproteinuria depending on the level of excretion (35).

The exercise training performed in this study did not alter the urinary excretion of protein in the trained group. A single exercise session may alter renal hemodynamics because an increase in blood flow to active muscles also

promotes increased intraglomerular pressure. An increase in efferent arteriole pressure secondary to exercise is thought to cause an increase in hydraulic pressure on proteins to pass through the glomerulus (3). In 2009, Ghosh and colleagues demonstrated that moderate exercise training performed by 7 weeks in *db/db* mice altered the proapoptotic environment in diabetic kidneys. Additionally, the same authors showed a reduction in renal caspase-3 activity (13).

In this study, both ET and previous ET attenuated the development of diabetic nephropathy as demonstrated by reduced urinary protein excretion. This improvement may also be due in part to recovery of RSNA.

The role of renal nerves in the onset and progression of diabetic nephropathy is controversial. In 2004, Luippold and colleagues demonstrated that chronic renal denervation prevents the progression of diabetic nephropathy in early diabetes by decreasing glomerular hyperfiltration (20). In contrast, Matsuoka et al. suggested that renal sympathetic denervation accelerates the development of nephropathy in an experimental diabetic model (22). Additional studies have shown that the levels of TGF- $\beta$ 1 and urinary albumin were increased in experimental diabetic model, and the authors suggested that renal denervation promoted renal injury (28, 29). In the present study, a decrease in RSNA was observed in the D group, with a concomitant increase in renal dysfunction as measured by decreased creatinine clearance and increased proteinuria and sodium and potassium fractional excretion. Moreover, exercise training performed in the TD and PTD groups was able to normalize RSNA. Taken together, these data suggest that ameliorates on renal function may be stimulated by improvements in RSNA in the trained diabetic groups. We also

found an inverse correlation between proteinuria and RSNA, this outcome may demonstrates the impact of normalization of renal activity in diabetic animals that performed ET.

Vascular changes in DM may reduce the responsiveness of renal vessels during perfusion pressure changes. Thus, a reduction in renal vessel responsiveness changes by blood pressure control may have an important impact during states of hyper- or hypoperfusion, thus increasing the vulnerability of the kidney to ischemic lesions and altering the mechanism of renal blood pressure control.

Several studies from our laboratory and others have demonstrated an impairment in autonomic function in rats and humans with DM (6, 10, 12, 15, 23, 32). Our results are in agreement with previous studies from our laboratory demonstrating decreased AP and HR in sedentary diabetic rats (7). Diabetic rats that were previously exercise-trained shown an increased SAP and HR. These beneficial increases in SAP and HR may be explained by increased sympathetic and parasympathetic modulation. However, the diabetic trained group did not demonstrate changes in the SAP. One possible explanation for this is that the amount of exercise training may influence the outcome. In 2009, Mostarda and colleagues demonstrated that an improvement in SAP occurred by increasing training to two times per day (23). Furthermore, De Angelis and colleagues demonstrated an attenuated SAP with these conditions. However, these authors did not demonstrated statistical significance in diabetic trained rats (7).

ET improves BRS and HRV in control trained and diabetic trained rats as well as previously trained diabetic rats. Despite an attenuation in BR, we did not

find any significant differences in BR in diabetic trained rats in comparison to D group, even with maintenance of absolute LF and HF components in both the TD and PTD groups. This difference may be explained by the degree of ET performed by the PTD group. Moreover, our laboratory demonstrated that an improvement in resting HR in diabetic trained rats and a concomitant improvement in HRV may be related to increased BRS. In the present study, we did not identify any improvement in resting HR in the TD group; however, the PTD group demonstrated an increase in both the resting HR and BR responses.

## **Conclusion**

Taken together, these findings indicate that previous exercise training performed in rats with DM induced by STZ protects against the development of diabetic nephropathy and cardiovascular autonomic dysfunction. Furthermore, generally speaking, a physically active lifestyle promotes even greater benefits to the individual with or without diabetes. The data from this study offer an opportunity to better understand the physiologic changes that occur before and after the establishment of DM.

## **Acknowledgements**

The present study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2008/07709-7), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), CAPES and Fundação Oswaldo Ramos (FOR). K De Angelis, M.C. Irigoyen and N. Schor were recipients of CNPq-BPQ fellowships.

## References

1. **Bardoux P, Martin H, Ahloulay M, Schmitt F, Bouby N, Trinh-Trang-Tan MM, and Bankir L.** Vasopressin contributes to hyperfiltration, albuminuria, and renal hypertrophy in diabetes mellitus: study in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10397-10402, 1999.
2. **Bell TD, DiBona GF, Wang Y, and Brands MW.** Mechanisms for renal blood flow control early in diabetes as revealed by chronic flow measurement and transfer function analysis. *J Am Soc Nephrol* 17: 2184-2192, 2006.
3. **Bergamaschi CT, Boim MA, Moura LA, Picarro IC, and Schor N.** Effects of long-term training on the progression of chronic renal failure in rats. *Med Sci Sports Exerc* 29: 169-174, 1997.
4. **Brooks GA and White TP.** Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol* 45: 1009-1015, 1978.
5. **Colberg SR, Sigal RJ, Fernhall B, Regensteiner JG, Blissmer BJ, Rubin RR, Chasan-Taber L, Albright AL, and Braun B.** Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. *Diabetes Care* 33: e147-167.
6. **Dall'ago P, D'Agord Schaan B, da Silva VO, Werner J, da Silva Soares PP, de Angelis K, and Irigoyen MC.** Parasympathetic dysfunction is associated with baroreflex and chemoreflex impairment in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Auton Neurosci* 131: 28-35, 2007.
7. **De Angelis KL, Oliveira AR, Dall'Ago P, Peixoto LR, Gadonski G, Lacchini S, Fernandes TG, and Irigoyen MC.** Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 33: 635-641, 2000.
8. **De Angelis Lobo d'Avila K, Gadonski G, Fang J, Dall'Ago P, Albuquerque VL, Peixoto LR, Fernandes TG, and Irigoyen MC.** Exercise reverses peripheral insulin resistance in trained L-NAME-hypertensive rats. *Hypertension* 34: 768-772, 1999.
9. **DiCarlo SE, Collins HL, Rodenbaugh DW, Smitha MR, Berger RD, and Yeragani VK.** Daily exercise reduces measures of heart rate and blood pressure variability in hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 24: 221-234, 2002.
10. **Dinh W, Futh R, Lankisch M, Bansemir L, Nickl W, Scheffold T, Bufe A, Krahn T, and Ziegler D.** Cardiovascular autonomic neuropathy contributes to left ventricular diastolic dysfunction in subjects with Type 2 diabetes and impaired glucose tolerance undergoing coronary angiography. *Diabet Med*.



11. **el Midaoui A, Tancrede G, and Nadeau A.** Effect of physical training on mitochondrial function in skeletal muscle of normal and diabetic rats. *Metabolism* 45: 810-816, 1996.
12. **Farah Vde M, De Angelis K, Joaquim LF, Candido GO, Bernardes N, Fazan R, Jr., Schaan BD, and Irigoyen MC.** Autonomic modulation of arterial pressure and heart rate variability in hypertensive diabetic rats. *Clinics (Sao Paulo)* 62: 477-482, 2007.
13. **Ghosh S, Khazaei M, Moien-Afshari F, Ang LS, Granville DJ, Verchere CB, Dunn SR, McCue P, Mizisin A, Sharma K, and Laher I.** Moderate exercise attenuates caspase-3 activity, oxidative stress, and inhibits progression of diabetic renal disease in db/db mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F700-708, 2009.
14. **Goodyear LJ and Kahn BB.** Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med* 49: 235-261, 1998.
15. **Harthmann AD, De Angelis K, Costa LP, Senador D, Schaan BD, Krieger EM, and Irigoyen MC.** Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats. *Auton Neurosci* 133: 115-120, 2007.
16. **Hayashi T, Wojtaszewski JF, and Goodyear LJ.** Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol* 273: E1039-1051, 1997.
17. **Johansen KL.** Exercise and chronic kidney disease: current recommendations. *Sports Med* 35: 485-499, 2005.
18. **La Rovere MT, Bigger JT, Jr., Marcus FI, Mortara A, and Schwartz PJ.** Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet* 351: 478-484, 1998.
19. **Lohmeier TE.** Interactions between angiotensin II and baroreflexes in long-term regulation of renal sympathetic nerve activity. *Circ Res* 92: 1282-1284, 2003.
20. **Luippold G, Beilharz M, and Muhlbauer B.** Chronic renal denervation prevents glomerular hyperfiltration in diabetic rats. *Nephrol Dial Transplant* 19: 342-347, 2004.
21. **Lundin S, Ricksten SE, and Thoren P.** Renal sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive controls, as studied by three different methods. *Acta Physiol Scand* 120: 265-272, 1984.
22. **Matsuoka H.** Protective role of renal nerves in the development of diabetic nephropathy. *Diabetes Res* 23: 19-29, 1993.

23. **Mostarda C, Rogow A, Silva IC, De La Fuente RN, Jorge L, Rodrigues B, Heeren MV, Caldini EG, De Angelis K, and Irigoyen MC.** Benefits of exercise training in diabetic rats persist after three weeks of detraining. *Auton Neurosci* 145: 11-16, 2009.
24. **Mousa TM, Liu D, Cornish KG, and Zucker IH.** Exercise training enhances baroreflex sensitivity by an angiotensin II-dependent mechanism in chronic heart failure. *J Appl Physiol* 104: 616-624, 2008.
25. **Niebauer J, Maxwell AJ, Lin PS, Tsao PS, Kosek J, Bernstein D, and Cooke JP.** Impaired aerobic capacity in hypercholesterolemic mice: partial reversal by exercise training. *Am J Physiol* 276: H1346-1354, 1999.
26. **Ramires PR, Forjaz CL, Strunz CM, Silva ME, Diament J, Nicolau W, Liberman B, and Negrao CE.** Oral glucose ingestion increases endurance capacity in normal and diabetic (type I) humans. *J Appl Physiol* 83: 608-614, 1997.
27. **Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, and De Angelis K.** Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 6: 38, 2007.
28. **Schaan BD, Irigoyen MC, Bertoluci MC, Lima NG, Passaglia J, Hermes E, Oliveira FR, Okamoto M, and Machado UF.** Increased urinary TGF-beta1 and cortical renal GLUT1 and GLUT2 levels: additive effects of hypertension and diabetes. *Nephron Physiol* 100: p43-50, 2005.
29. **Schaan BD, Irigoyen MC, Lacchini S, Moreira ED, Schmid H, and Machado UF.** Sympathetic modulation of the renal glucose transporter GLUT2 in diabetic rats. *Auton Neurosci* 117: 54-61, 2005.
30. **Silva GJ, Brum PC, Negrao CE, and Krieger EM.** Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 30: 714-719, 1997.
31. **Soares PP, da Nobrega AC, Ushizima MR, and Irigoyen MC.** Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. *Auton Neurosci* 113: 24-31, 2004.
32. **Souza SB, Flues K, Paulini J, Mostarda C, Rodrigues B, Souza LE, Irigoyen MC, and De Angelis K.** Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. *Hypertension* 50: 786-791, 2007.
33. **Weston PJ, James MA, Panerai R, McNally PG, Potter JF, Thurston H, and Swales JD.** Abnormal baroreceptor-cardiac reflex sensitivity is not detected by conventional tests of autonomic function in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)* 91: 59-64, 1996.

34. **Winnick JJ, Sherman WM, Habash DL, Stout MB, Failla ML, Belury MA, and Schuster DP.** Short-term aerobic exercise training in obese humans with type 2 diabetes mellitus improves whole-body insulin sensitivity through gains in peripheral, not hepatic insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 771-778, 2008.
35. **Wolf G.** Molecular mechanisms of diabetic mesangial cell hypertrophy: a proliferation of novel factors. *J Am Soc Nephrol* 13: 2611-2613, 2002.
36. **Zheng H, Li YF, Zucker IH, and Patel KP.** Exercise training improves renal excretory responses to acute volume expansion in rats with heart failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: F1148-1156, 2006.
37. **Zimmet PZ, McCarty DJ, and de Courten MP.** The global epidemiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *J Diabetes Complications* 11: 60-68, 1997.

## Tables

Table 1 – Body weight, Blood glucose and Maximal running test in control (C), sedentary diabetic (D), trained control (TC), trained diabetic (TD) and previous trained diabetic (PTD) groups.

Parameter/Group	C	D	TC	TD	PTD
Body weight (g)					
Initial	184±2	188±2	184±2	193±2	191±3
End of week 4	321±9	303±5	321±9	314±5	311±7
Final	405±10	233±6*	379±4#	282±11*#+	343±18*#+\$
Blood glucose (mg/dL)					
Initial	90±1	88±2	92±2	92±2	89±2
After induction (Day 5)	88±1	380±29*	91±1#	369±20*+	379±33*+
Final	87±2	497±19*&	89±3#	379±20*#+	365±19*#+
Maximal running test (km/h)					
Initial	1.10±0.09	1.10±0.07	1.10±0.07	1.20±0.07	1.20±0.06
End of week 4	1.20±0.06	1.20±0.08	1.20±0.06	1.20±0.07	1.90±0.10≠
Final	1.20±0.10	1.00±0.05*	2.40±0.10*#	1.80±0.07*#+	2.30±0.09*#&

The results are expressed in mean ± SEM. ANOVA one way, \* p<0.05 vs. C, # p<0.05 vs. D, + p<0.05 vs. TC, \$ p<0.05 vs. TD, & p<0.05 vs. after induction, ≠ p<0.05 vs. all groups.

Table 2 – Serum creatinine, creatinine clearance, proteinuria, fractional excretion of sodium (FES) and potassium (FEP) in control (C), sedentary diabetic (D), trained control (TC), trained diabetic (TD) and previous trained diabetic (PTD).

Parameter/Group	C	D	TC	TD	PTD
Creatinine clearance (ml/min)					
Initial	1.08±0.08	1.25±0.06	1.10±0.03	1.22±0.08	1.18±0.09
Final	1.12±0.09	0.65±0.11*	1.05±0.05#	1.79±0.37*##+	1.70±0.24*##+
Serum creatinine (mg/dL)					
Initial	0.78±0.05	0.78±0.02	0.75±0.03	0.73±0.03	0.73±0.05
Final	0.75±0.05	1.43±0.11≠	0.70±0.02	0.68±0.06	0.78±0.04
Proteinuria (mg/24 h)					
Initial	15.2±2.3	15.7±1.2	14.8±1.4	15.4±1.5	13.4± 0.7
Final	17.5±1.8	90.6±5.7*	12.4±0.8#	46.8±4.1*##+	36.9±10.2*##+
FES (%)					
Initial	0.37± 0.02	0.40± 0.02	0.36± 0.02	0.39± 0.02	0.50± 0.07
Final	0.41± 0.01	2.40± 0.30≠	0.41± 0.07	0.99± 0.02	0.72± 0.06
FEP (%)					
Initial	3.00±0.05	2.90±0.56	2.90±0.20	3.00±0.56	2.80±0.40
Final	3.20±0.20	6.80±1.20≠	3.10±0.34	3.2±0.54	2.90±0.90

The results are expressed in mean ± SEM. ANOVA one way, \* p<0.05 vs. C, # p<0.05 vs. D, + p<0.05 vs. TC, ≠ p<0.05 vs. all groups.

Table 3 – Hemodynamic and autonomic parameters in control (C), sedentary diabetic (D), trained control (TC), trained diabetic (TD) and previous trained diabetic (PTD).

Parameter/Group	C	D	TC	TD	PTD
Hemodynamic					
SAP (mmHg)	128±8	107±1*	128±6#	112±3*+	126±5#\\$
DAP (mmHg)	92±4	83±1	86±2	89±4	91±1
MAP (mmHg)	109±6	97±1	98±1	103±5	108±1
HR (bpm)	326±14	283±9*	320±7#	270±5*+	300±6\\$
Heart rate variability					
PI Variance (ms <sup>2</sup> )	95±33	41±2#	107± 21	82±12	93±7
RMSSD (ms)	6.15±0.50	5.07±0.31	7.52±0.51	11.50±1.80*#+	11.20±0.20*#+
LF band (ms)	4.20±0.86	1.87±0.37#	4.97±1.06	4.92±1.38	4.36±0.65
HF band (ms)	10.71±2.3	6.46±0.6	15.90±2.3#	23.60±2.7*#+	14.42±1.4#\\$
Blood pressure variability					
SAP Variance(mmHg <sup>2</sup> )	24±2.90	6±0.44*	31±3.00*#	10±4.40*+	12± 1.70*+

The results are expressed in mean ± SEM. ANOVA one way, \* p<0.05 vs. C, # p<0.05 vs. D, + p<0.05 vs. TC, \\$ p<0.05 vs. TD, ≠ p<0.05 vs. all groups.

## Legends of figures

Figure 1 – Tachycardic and bradycardic responses evaluated by vasoactive drugs (phenylephrine and sodium nitroprusside) in control (C), sedentary diabetic (D), trained control (TC), trained diabetic (TD) and previous trained diabetic (PTD). Data are reported as mean  $\pm$  SEM. ANOVA one way, \*  $p < 0.05$  vs. C, #  $p < 0.05$  vs. D, \$  $p < 0.05$  vs. TD.

Figure 2 – Renal sympathetic nerve activity in control (C), sedentary diabetic (D), trained control (TC), trained diabetic (TD) and previous trained diabetic (PTD). Data are reported as mean  $\pm$  SEM. ANOVA one way,  $\neq$   $p < 0.05$  vs. all groups.

### Figure 3

(A) Inverse Pearson correlation between proteinuria (mg/24 h) and RSNA (mV/cycle) ( $r = -0.76$ );

(B) Inverse Pearson correlation between proteinuria (mg/24 h) and PI variance ( $\text{ms}^2$ ) ( $r = -0.76$ ).

Figure 1

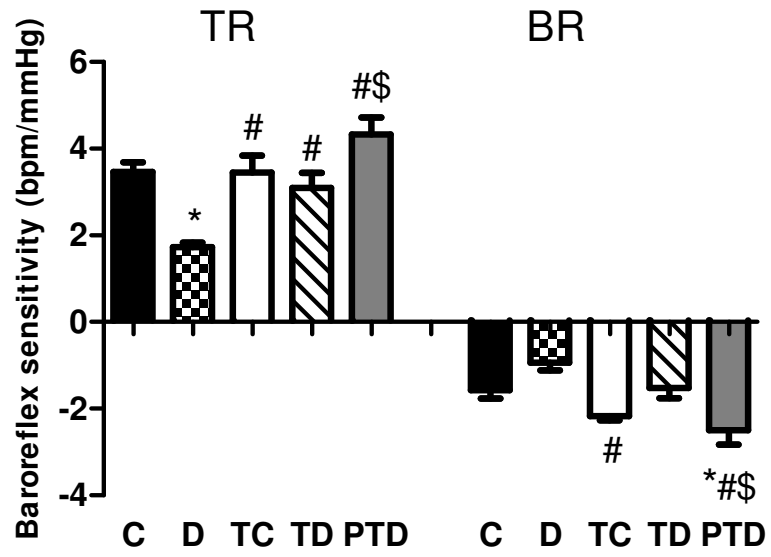




Figure 2

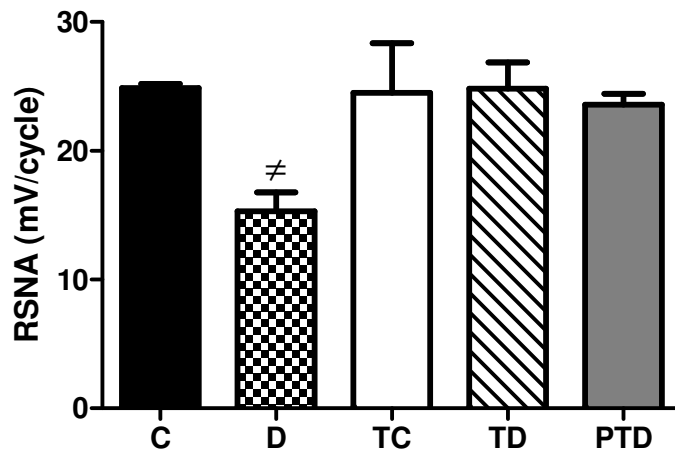
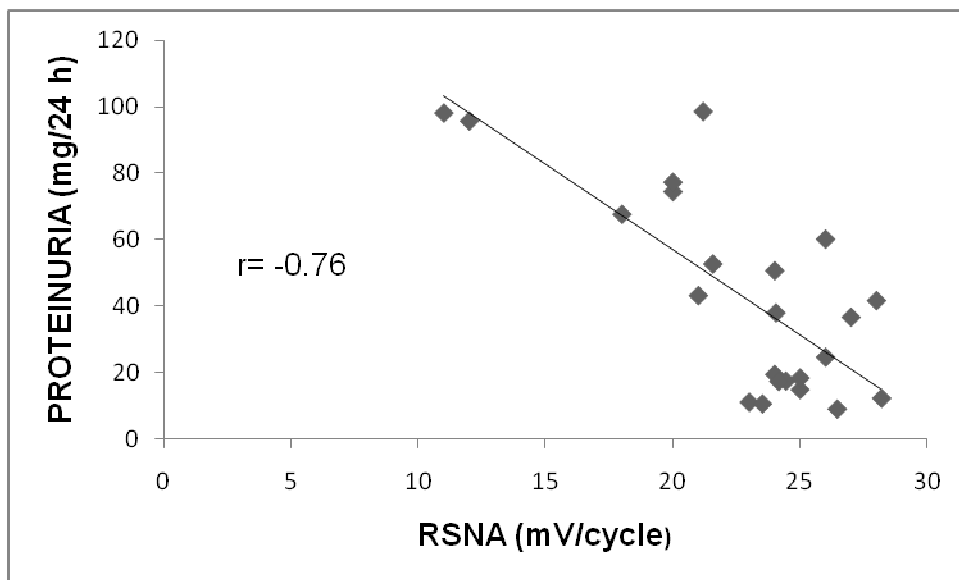


Figure 3

A



B

