

Natasha Priscilla Xavier

**Influência do Antioxidante Quercetina sobre
a Remodelação Cardíaca e a Atividade
Oxidativa de Ratos com Diabetes Mellitus**

Orientador: Prof. Adjunto *Katashi Okoshi*

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. *Ana Angélica H. Fernandes*

Botucatu – São Paulo

2012

Natasha Priscilla Xavier

**Influência do Antioxidante Quercetina sobre
a Remodelação Cardíaca e a Atividade
Oxidativa de Ratos com Diabetes Mellitus**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
“Fisiopatologia em Clínica Médica” da Faculdade de
Medicina de Botucatu, Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, para
obtenção de título de Doutor em Fisiopatologia em
Clínica Médica – Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Adjunto *Katashi Okoshi*

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. *Ana Angélica H. Fernandes*

Botucatu – São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Xavier, Natasha Priscilla.

Influência do antioxidante quercetina sobre a remodelação cardíaca e a atividade oxidativa de ratos com diabetes mellitus / Natasha Priscilla Xavier. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Katashi Okoshi

Coorientador: Ana Angélica Henrique Fernandes

Capes: 40101100

1. Antioxidantes. 2. Diabetes. 3. Estresse oxidativo. 4. Miocárdio – Doenças.

Palavras-chave: Antioxidante; Cardiomiopatia diabética; Estresse oxidativo; Quercetina; Ratos; Remodelamento cardíaco.

Dedicatória

*A Deus,
ao meu marido Miguel,
ao meu tio João Batista,
ao meu avô Wardelen,
à minha avó Angela,
à minha mãe Luci e
à minha tia Alcione*

A agradecimientos

Ao Prof. Dr. **Katashi Okoshi**, meu orientador, pela inestimável contribuição, amizade, irrestrito apoio e dedicação em todos os momentos. Pela oportunidade e confiança a mim concedida. Tê-lo como orientador foi uma honra. Seus ensinamentos jamais serão esquecidos. Meus sentimentos de gratidão e admiração estão perpetuados.

À Prof^a. Dr^a. **Marina Politi Okoshi**, pela amizade e pelas preciosas contribuições em todos os momentos.

À Prof^a. Dr^a. **Ana Angélica Henrique Fernandes** pela co-orientação.

Ao Prof. Titular **Antônio Carlos Cicogna** por toda contribuição e ensinamentos.

À Prof^a. Adjunta **Célia Regina Nogueira**, pela gentileza de permitir o uso de seu laboratório.

À Prof^a. Dr^a. **Meliza Goi Roscani** e à Prof^a. Dr^a. **Silméia Garcia Zanati** pelas valiosas contribuições no exame de qualificação, importantes para a redação final da tese.

Ao Prof. Titular **Carlos Roberto Padovani** pela indicação e esclarecimento em relação aos testes estatísticos que seriam mais apropriados.

À minha amiga **Camila M. Rosa** e ao meu amigo **Dijon**, que sempre colaboraram prontamente e principalmente pela amizade.

À minha amiga **Ana Carolina P.G. Sano** que contribuiu com sugestões gramaticais para a redação final da tese.

Aos colegas de laboratório: **Fernanda, Camila Gimenes, Miriane, Regiane, Gabriel, Juliana, Rodrigo Gimenes, Dani Tomaz, Dani Guizoni, Camila Bonomo, Maria Tereza, Heloísa, Bruna, Adriana, Carlos, Marcelo, Aline, Ana Paula, André Leopoldo, André Nascimento, Renata, Paula, Silvio, Paulinha, Lorena, Arthur, Louise, Ariane, Bruno, Dani, Carol, Paulo, Loreta, Renata, Lidiane, Priscila, Ricardo, Cristiana, Bertha, Marcos, Rosângela, Rodrigo e Damiana.** Muito obrigada pela amizade e colaboração na realização deste trabalho.

A todos os funcionários do Laboratório Experimental de Clínica Médica: **José Carlos, Corina, Elenize, Camila, Mário, Rogério, De Lalla, Ângelo, José Aparecido, Sueli Clara, Denise, Vitor, Marta e Sandra,** por todo apoio prestado.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica: **Alexandre L. Loureiro, Ana Maria Mengue, Bruno José Fajiolli, Elisângela A. Silva, Laura A. Câmara, Mário A. Dallaqua, Renato B. Pereira** e aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela atenção e profissionalismo.

À **Niva**, funcionária da Biblioteca da Faculdade de Medicina de Botucatu, por sempre me atender nas solicitações de artigos.

À **CAPES**, pelo suporte financeiro recebido durante à elaboração da pesquisa.

À toda minha família, por todo incentivo.

Ao meu marido **Miguel**, por todo apoio e paciência em todos os momentos.

A todos que não citei o nome, mas que contribuíram direta ou indiretamente e tornaram possível a realização deste trabalho.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	1
RESUMO	6
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Animais e Constituição dos Grupos Experimentais	22
3.2 Aferição da Pressão Arterial.....	23
3.3 Estudo Ecocardiográfico.....	24
3.4 Estudo do Músculo Isolado	25
3.5 Análise Histológica do Coração	27
3.6 Análise de Variáveis Anatômicas.....	28
3.7 Quantificação de Hidroxiprolina	28
3.8 Obtenção de Amostras para Avaliação do Estresse Oxidativo	29
3.8.1 Determinações Séricas e Cardíacas.....	30
3.8.1.1 Determinação de Hidroperóxido de Lipídio.....	30
3.8.1.2 Determinação da Atividade de Glutathiona Peroxidase (GSH-Px)	30
3.8.1.3 Determinação da Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)	31
3.9 Avaliação da Expressão Gênica das Proteínas Reguladoras do Trânsito de Cálcio no Miocárdio por RT-PCR em Tempo Real	31
3.9.1 Extração de RNA com Trizol	32
3.9.2 Gel Analítico de Agarose para RNA	33
3.9.3 Transcrição Reversa (RT) do RNA.....	33
3.9.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real.....	34
3.10 Análise Estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1 Caracterização da Amostra quanto ao Peso Corporal, Glicemia e Pressão Arterial Sistólica	37
4.2 Avaliação Ecocardiográfica.....	39
4.3 Estudo Funcional do Músculo Papilar	45
4.3.1 Condição Basal	45
4.3.2 Manobras Inotrópicas.....	48
4.4 Variáveis Anatômicas	50
4.5 Concentração de Hidroxiprolina e Fração Colágena Intersticial Miocárdica	50
4.6 Avaliação do Estresse Oxidativo.....	52
4.7 Avaliação da Expressão Gênica Por RT-PCR	55
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

Lista de A breviaturas e Siglas

AE:	diâmetro do átrio esquerdo
AGE:	produtos finais da glicação avançada
ANOVA:	análise de variância
AO:	diâmetro da aorta
ATP:	trifosfato de adenosina
BHT:	butilato hidroxitolueno
$[Ca^{+2}]_o$:	concentração extracelular de cálcio
CaCl ₂ :	cloreto de cálcio
CO ₂ :	dióxido de carbono
CTGF:	fator de crescimento de tecido conjuntivo
CTL:	grupo controle
DDVE:	diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DEPC:	dietilpirocarbonato
DM:	diabetes mellitus
DM+QC:	grupo diabético que recebeu quercetina
DNA:	ácido desoxirribonucléico
+dP/dt _{max} :	derivada positiva máxima da pressão ventricular
-dP/dt _{max} :	derivada negativa máxima da pressão ventricular
DSVE:	diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
+dT/dt:	derivada positiva máxima da tensão desenvolvida
-dT/dt:	derivada negativa máxima da tensão desenvolvida
E/A:	razão entre as ondas E e A
EDPP:	espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo
EDSIV:	espessura diastólica do septo interventricular
EDTA:	ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO:	espécies reativas de oxigênio
Esp. Rel. VE:	espessura relativa do ventrículo esquerdo
FC:	frequência cardíaca
FCI:	fração de colágeno intersticial
FE:	fração de ejeção
GF:	glicemia final
GI:	glicemia inicial
GSH:	glutaciona reduzida
GSH-Px:	glutaciona peroxidase
GSSG:	glutaciona oxidada
HOP VE:	concentração de hidroxiprolina no miocárdio do ventrículo esquerdo
Iso:	isoproterenol
KCl:	cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄ :	di-hidrogenofosfato de potássio monobásico
MgSO ₄ :	sulfato de magnésio
MVE:	massa do ventrículo esquerdo
NaCl:	cloreto de sódio
NADPH oxidase:	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NADPH ₂ :	metilenotetraidrofolato redutase
NAD ⁺ :	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaHCO ₃ :	bicarbonato de sódio
NBT:	nitroblue-tetrazólico
O ₂ :	oxigênio
O ₂ ⁻ :	radical superóxido

Onda A:	pico de velocidade do fluxo transmitral decorrente da contração atrial
Onda E:	pico de velocidade de fluxo transmitral na fase de enchimento inicial
PAS:	pressão arterial sistólica
PC:	peso corporal
PCF:	peso corporal final
PCI:	peso corporal inicial
PLB:	fosfolamban
PP30:	pós pausa de 30 segundos
PPAR α :	receptores α ativados por proliferador do peroxissoma
QC:	grupo que recebeu quercetina
RAGE:	receptores de AGE
RNA:	ácido ribonucléico
RNase H:	ribonuclease H
RT:	transcrição reversa
RT-PCR:	reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa
RyR-2:	receptor rianodínico tipo 2
SERCA-2a:	Ca ⁺² -ATPase do retículo sarcoplasmático
SOD:	superóxido dismutase
TD:	tensão desenvolvida máxima
TDE:	tempo de desaceleração da onda E
TGF- β :	fator de transformação do crescimento beta
TPT:	tempo para atingir o pico de tensão desenvolvida

TR:	tensão de repouso
TRIV:	tempo de relaxamento isovolumétrico
TRIVn:	TRIV normalizado pela frequência cardíaca
VD:	ventrículo direito
VE:	ventrículo esquerdo
VEPP:	velocidade de encurtamento da parede posterior
% Δ endo:	porcentagem de encurtamento endocárdico

Resumo

O diabetes mellitus (DM) pode produzir alterações metabólicas, fibrose intersticial, hipertrofia miocárdica, doença microvascular e disfunção autonômica, que resultam em doença miocárdica. O comprometimento miocárdico pode ser decorrente do aumento de espécies reativas de oxigênio. Os antioxidantes, como a quercetina, podem ser úteis na prevenção das complicações do DM. Neste estudo, testamos a hipótese de que o DM causa aumento do estresse oxidativo e disfunção miocárdica, e que a quercetina é capaz de atenuar essas alterações. Foram utilizados ratos Wistar divididos em quatro grupos: 1) controle (CTL, n=24); 2) quercetina (QC, n=29); 3) diabético (DM, n=35); e 4) diabético + quercetina (DM+QC, n=32). O diabetes foi induzido por estreptozotocina e a administração de quercetina foi iniciada 7 dias após a indução de DM durante 10 semanas. A avaliação estrutural e funcional *in vivo* do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada por ecocardiograma. O estudo funcional *in vitro* foi realizado pela avaliação do músculo papilar do VE. Para análise de variáveis anatômicas foram medidos os pesos úmidos e secos do VE, ventrículo direito, átrios e amostras de fígado e pulmão. A medida da fração colágena intersticial foi realizada em cortes histológicos do VE. Amostras do VE foram utilizadas para quantificar a concentração de hidroxiprolina. O estresse oxidativo miocárdico e sérico foi avaliado pela dosagem de hidroperóxido de lipídio, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. O estudo foi complementado pela avaliação da expressão gênica de proteínas reguladoras do trânsito intracelular de cálcio (Ca⁺²-ATPase do retículo sarcoplasmático - SERCA-2a, fosfolamban - PLB e receptor rianodínico tipo 2 - RyR-2). O número final de animais em cada grupo experimental foi de 19 no CTL, 21 no QC, 24 no DM e 19 no DM+QC. No final do experimento, o peso corporal foi estatisticamente menor e a glicemia maior nos animais diabéticos. A análise ecocardiográfica mostrou que os grupos diabéticos

apresentaram dilatação do VE e do átrio esquerdo e a quercetina atenuou o aumento do diâmetro do átrio esquerdo. Como os valores da espessura relativa do VE não diferiram entre os grupos, a dilatação do VE foi acompanhada de aumento proporcional de suas paredes. Os valores de massa do VE/peso corporal obtidos por ecocardiograma ou medidos *post mortem* mostraram-se maiores nos grupos diabéticos. A função sistólica do VE apresentou-se comprometida no grupo DM e a quercetina foi capaz de atenuar a redução da porcentagem de encurtamento endocárdico e da fração de ejeção. Nos grupos diabéticos a função diastólica do VE mostrou-se alterada e a quercetina não apresentou efeito nestes índices. Na análise do músculo papilar, o grupo DM apresentou piora da função contrátil e de relaxamento na condição basal e após manobras para avaliação da reserva contrátil e a quercetina preveniu ou atenuou tais alterações. No estudo anatômico, os pesos do VE, do ventrículo direito e dos átrios, quando normalizados pelo peso corporal, foram maiores nos grupos diabéticos. A avaliação do tecido colágeno pela medida da concentração miocárdica de hidroxiprolina revelou elevação significativa nos grupos diabéticos. A medida da fração colágena intersticial mostrou aumento nos grupos diabéticos, mas não atingiu significância estatística. A quercetina não causou efeito benéfico nessas variáveis. A expressão gênica da SERCA-2a foi significativamente reduzida nos grupos diabéticos e a quercetina não interferiu em sua expressão. Em relação à PLB e RyR-2, não houve diferença da expressão gênica entre os grupos. As análises da atividade oxidativa no soro e no VE mostraram aumento nos grupos diabéticos e, no soro, a quercetina foi capaz de atenuar ou normalizar o estresse oxidativo. Concluindo, no modelo experimental de diabetes mellitus em ratos ocorre remodelação cardíaca associada a aumento do estresse oxidativo, que é atenuada ou normalizada pelo antioxidante quercetina. No

entanto, a redução da expressão gênica da SERCA-2a miocárdica não se altera com a quercetina.

Palavras-chave: antioxidante, cardiomiopatia diabética, estresse oxidativo, quercetina, remodelamento cardíaco, ratos.

A bstract

Diabetes mellitus (DM) can cause myocyte hypertrophy, cardiac metabolic changes, interstitial fibrosis, microvascular disease, and autonomic dysfunction, resulting in myocardial disease. Increase of reactive oxygen species is one of the main mechanisms of myocardial injury. Antioxidants, such as quercetin, can be useful to prevent DM complications. In this study, we tested the hypothesis that DM increases oxidative stress and induces myocardial dysfunction, and quercetin can attenuate these changes. Wistar rats were divided into four groups: 1) control (CTL, n=24); 2) quercetin (QC, n=29); 3) diabetes (DM, n=35); and 4) diabetic + quercetin (DM+QC, n=32). Diabetes was induced by streptozotocin. Seven days later quercetin administration was started and maintained for 10 weeks. In vivo cardiac structural and functional assessment was performed by echocardiography. In vitro myocardial function was studied on left ventricular papillary muscle. For anatomical post mortem analysis, wet and dry weights of left ventricle (LV), right ventricle, atria, and samples of liver and lung were measured. Interstitial collagen fraction was measured on LV histological sections. Left ventricular samples were used to quantify hydroxyproline concentration. Left ventricular myocardial and serum oxidative stress were evaluated by measuring lipid hydroperoxide, superoxide dismutase and glutathione peroxidase. Gene expression of proteins involved in the intracellular calcium transient (Ca^{+2} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum - SERCA-2a, phospholamban – PLB, and ryanodine receptor type 2 - RyR-2) was evaluated by RT-PCR. The final number of animals in each experimental group was 19 in CTL, 21 in QC, 24 in DM, and 19 in the DM+QC. At the end of the experiment, body weight was lower and serum glucose higher in diabetic animals. The echocardiographic analysis showed that the diabetic group had a dilated LV and left atrium and quercetin attenuated the increase of left atrial diameter. Since the values of LV

relative wall thickness did not differ between groups, LV dilation was accompanied by proportional increase of LV wall thickness. LV mass/body weight ratio evaluated by echocardiography or measured post mortem was higher in both diabetic groups. The LV systolic function was impaired in the DM group; quercetin administration attenuated the reduction of endocardial fractional shortening and ejection fraction. The LV diastolic function was altered in diabetic groups and quercetin had no effect on this function. In the analysis of papillary muscle function, the DM group presented worsening of contractile function and relaxation, at basal condition and after inotropic stimulation for assessment contractile reserve, and quercetin prevented or attenuated these changes. In the anatomical evaluation, weights of LV, right ventricle, and atria normalized by body weight were higher in diabetic groups. The evaluation of collagen tissue by measuring myocardial hydroxyproline concentration revealed a significant increase in the diabetic groups. Interstitial collagen fraction was increased in the diabetic groups, but with no significant difference. Quercetin caused no beneficial effect on these variables. Gene expression of SERCA-2a was significantly reduced in diabetic groups and quercetin did not interfere with its expression. PLB and RyR-2 gene expression did not differ between groups. Oxidative activity in serum and LV was increased in diabetic groups; quercetin reduced or normalized oxidative stress in serum. In conclusion, diabetes mellitus-induced cardiac remodeling and increased oxidative stress in rats is attenuated or prevented by the antioxidant quercetin. However, quercetin administration does not ameliorate the reduction of myocardial SERCA-2a gene expression.

Key-words: antioxidants, diabetic cardiomyopathy, oxidative stress, quercetin, cardiac remodeling, rats.

1.1 Introdução

O diabetes mellitus (DM), segundo a Organização Mundial da Saúde, é uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada por hiperglicemia crônica, que acarreta distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas resultantes de defeitos na secreção e/ou ação da insulina.¹

No ano 2000, a prevalência de DM era de 2,8% na população mundial, equivalente a 171 milhões de pessoas. Estima-se que para 2030 a prevalência seja de 4,4% na população mundial, representando cerca de 366 milhões de pessoas acometidas pela doença.² Em outro estudo, Shaw et al.³ realizaram uma estimativa da prevalência mundial de DM na faixa etária de 20 a 79 anos, e concluíram que em 2010 seria de 6,4% (285 milhões) e aumentaria para 7,7% (439 milhões) em 2030. De acordo com esse estudo, entre 2010 e 2030 haveria aumento de 69% no número de adultos com DM em países em desenvolvimento e aumento de 20% em países desenvolvidos.

Em relação ao Brasil, um estudo da população urbana de Ribeirão Preto, SP, na faixa etária de 30 a 69 anos, mostrou prevalência de DM de 12,1%.⁴ Outro estudo realizado em São Carlos, SP, na faixa etária de 30 a 79 anos, encontrou prevalências de DM e tolerância diminuída à glicose de 16,6% e 6,2%, respectivamente.⁵ De acordo com dados do DATASUS, em 2009 a prevalência de DM era de 9,5% na população brasileira acima de 34 anos de idade.⁶

No DM, os distúrbios do metabolismo de glicose causam complicações que envolvem as doenças cardiovasculares progressivas e severas, incluindo hipertensão arterial sistêmica, insuficiência cardíaca e doença arterial coronariana, sendo que 75% dos pacientes diabéticos morrem por algum desses eventos cardiovasculares.⁷⁻¹¹ As complicações crônicas do DM são as principais

responsáveis pela morbidade e mortalidade dos pacientes diabéticos.

Dentre as diversas complicações cardíacas que surgem em decorrência do diabetes, a cardiomiopatia diabética não aterogênica tem sido reconhecida como forma única de doença cardíaca em aproximadamente 30% dos pacientes com DM insulino-dependente, apresentando-se precocemente com anormalidade na função diastólica seguida de disfunção sistólica do ventrículo esquerdo.^{12,13}

A diversidade de mecanismos propostos para a patogênese da cardiomiopatia diabética reflete a sua natureza multifatorial e complexa.¹⁴ Segundo Codinach Huix & Freixa Pamias,¹² o diabetes pode produzir alterações metabólicas, fibrose intersticial, hipertrofia miocárdica, doença microvascular e disfunção autonômica, sendo que todas essas alterações seriam responsáveis pela doença miocárdica. Nesse aspecto, a disfunção ventricular tem sido descrita em pacientes diabéticos, jovens, assintomáticos, sem outras doenças que poderiam afetar o músculo cardíaco, sendo nesse caso o diabetes considerado a única causa da doença miocárdica.^{12,15-19}

O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é um dos principais fatores responsáveis pelo comprometimento miocárdico decorrente do DM.²⁰⁻²² Evidências sugerem que o acentuado aumento do metabolismo da glicose está associado à formação aumentada de ERO devido ao aumento da produção mitocondrial do ânion superóxido, além de falhas no sistema antioxidante como redução da glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase.²³⁻²⁶

Os quatro principais mecanismos responsáveis pelos danos oxidativos

hiperglicêmicos são: glicação não enzimática de proteínas e lípidos e auto-oxidação da glicose com consequente formação de produtos finais da glicação avançada (AGE); aumento do fluxo através da via dos polióis; ativação de isoformas de proteína C quinase; e aumento do fluxo da via de hexosaminas.^{23,27-30} O aumento de AGE promove a formação de ligações irreversíveis com várias macromoléculas. Por exemplo, a sua ligação ao colágeno induz fibrose intersticial, e a ligação às proteínas Ca⁺²-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA-2a) e ao receptor rianodínico (RyR-2), responsáveis pelo trânsito intracelular de cálcio, causa inativação ou redução de suas funções.³¹⁻³³ Além disso, pode haver redução da quantidade de SERCA-2a decorrente de aumento de hexosamina no miócito.³⁴ Estes dados fornecem evidências para a associação entre hiperglicemia e alteração da expressão e função das enzimas SERCA-2a e RyR-2, com consequente piora do relaxamento, contratilidade e rigidez miocárdica.^{35,36} De acordo com a relação entre hiperglicemia e alterações subcelulares, foi verificado que a severidade da disfunção diastólica do ventrículo esquerdo em pacientes diabéticos se correlaciona positivamente com os valores séricos da hemoglobina glicada.³⁷

Na prevenção das complicações crônicas do diabetes, é consenso a necessidade da manutenção de um controle glicêmico satisfatório por meio de medicamento, dieta adequada, controle de peso corporal e atividade física regular.

Os antioxidantes têm gerado grande interesse devido aos efeitos potencialmente benéficos no DM.³⁸⁻⁴⁰ Estudos realizados em cultura de células vasculares, em animais de laboratório e em pacientes diabéticos têm mostrado que antioxidantes como as vitaminas C e E, o beta-caroteno, o ácido lipóico, entre outros, podem ser úteis na prevenção do desenvolvimento e progressão das complicações

do DM.⁴¹⁻⁵⁰ No entanto, há outros estudos mostrando resultados divergentes quanto ao benefício dessas substâncias, em particular a vitamina E, que em pacientes diabéticos não mostrou efeito esperado.⁵¹⁻⁵⁴

Entre os principais antioxidantes presentes na dieta, além das vitaminas, estão os flavonóides como a quercetina.⁵⁵ Em estudos experimentais com ratos diabéticos, os flavonóides mostraram melhora dos níveis glicêmico e lipídico, da atividade das ERO e das funções miocárdica e cardíaca.⁵⁶⁻⁵⁸ A administração de quercetina resultou em menores níveis plasmáticos de glicemia, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e hidroperóxidos. Além disso, regularizou a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, atenuando dessa forma as reações ocasionadas pelo estresse oxidativo.⁵⁹ Em outro estudo de diabetes induzido por estreptozotocina em ratos, a quercetina demonstrou efeito protetor diminuindo a lipoperoxidação e a produção de óxido nítrico e aumentando a atividade enzimática antioxidante. Além disso, ocorreu maior preservação das células das ilhotas pancreáticas no grupo tratado com quercetina.⁶⁰

Apesar dos vários estudos mostrarem efeito benéfico da quercetina no DM, há relato de efeito desfavorável, com intensificação dos efeitos do DM como aumento na lipoperoxidação e alterações na atividade da glutathiona peroxidase e da catalase.⁶¹

O estudo do efeito direto da hiperglicemia sobre o miocárdio tem merecido pouca atenção e muitas pesquisas, especialmente *in vitro*, têm direcionado principalmente para mecanismos moleculares através das alterações patológicas nas células de músculo liso vascular e das células endoteliais.⁶²⁻⁶⁴ Experimentos em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina têm mostrado depressão da

contratilidade miocárdica, redução da complacência ventricular e menor resposta inotrópica e cronotrópica às drogas estimulantes.^{65,66} No modelo experimental de agressão cardíaca induzida por doxorubicina, os flavonóides mostraram efeito benéfico sobre o miocárdio.⁶⁷⁻⁷⁰

Diante do exposto, a hipótese deste estudo é que o DM, induzido por estreptozotocina em ratos, causa aumento da atividade do estresse oxidativo e disfunção ventricular, e o flavonóide quercetina é capaz de atenuar essas alterações.

2. Objetivos

Avaliar a influência do antioxidante quercetina sobre a remodelação cardíaca e a atividade oxidativa de ratos com diabetes mellitus induzido por estreptozotocina, além de investigar a expressão gênica de proteínas reguladoras do trânsito intracelular de cálcio.

3. Material e Métodos

3.1 Animais e Constituição dos Grupos Experimentais

Foram utilizados 120 ratos Wistar, machos, com peso corporal (PC) inicial de 326 ± 2 g, provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista, UNESP. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- Controle (CTL, n=24): ratos normais
- Quercetina (QC, n=29): ratos normais que receberam quercetina
- Diabético (DM, n=35): ratos diabéticos
- Diabético + quercetina (DM+QC, n=32): ratos diabéticos que receberam quercetina

Todos os grupos receberam ração comercial e água *ad libitum*.

A indução de DM foi realizada por meio da administração intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina (Sigma Chemicals Company), em dose única, na concentração de 50 mg/kg de PC, diluída em tampão citrato 0,1 M e pH 4,5.⁷¹⁻⁷³ Os animais controle receberam apenas a solução tampão.

Sete dias após a administração de estreptozotocina ou tampão, amostras de sangue foram retiradas pela punção da cauda e a glicemia foi determinada através de um glicosímetro (Advantage®).⁷⁴ Os animais que apresentaram concentração de glicose sérica acima de 220 mg/dL foram

considerados diabéticos e incluídos nos grupos diabéticos.⁷⁵⁻⁷⁷ A determinação de glicemia sérica foi realizada também no início (antes da indução do DM) e ao final do período experimental.

Os ratos pertencentes ao grupo DMQC, após confirmado o estado diabético, e aqueles integrantes do grupo QC receberam, semanalmente, o flavonóide quercetina (Sigma Chemicals Company), na concentração de 50 mg/kg i.p. diluída em propileno glicol, durante 10 semanas.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais, sendo mantidos em ambiente com temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (ciclos 12/12 horas claro/escuro) controlados. Além disso, os ratos foram pesados semanalmente.

3.2 Aferição da Pressão Arterial

A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida na cauda do animal ao final do período experimental. Para aferição da PAS foi utilizado o método da pletismografia.⁷⁸ Os ratos foram colocados em uma caixa de madeira (50x40 cm), forrada com maravalha de pinus autoclavada, à temperatura de 40°C por 5 minutos com a finalidade de causar vasodilatação da artéria caudal. Para aferição da PAS foi utilizado o eletro-esfigmomanômetro *Narco Bio-System*[®], modelo 709-0610 (*International Biomedical Inc.*, USA). O manguito foi posicionado em torno da cauda do animal e conectado a um transdutor de pressão (*Gould*, OH, USA). Em seguida, o manguito foi insuflado a um valor superior à PAS e desinsuflado. O registro das curvas de PAS foi feito por um polígrafo (*Gould*, modelo RS 3200, OH, USA).

3.3 Estudo Ecocardiográfico

O ecocardiograma foi realizado no final do período experimental. Os ratos foram submetidos à sedação com cloridrato de cetamina (50 mg/kg, i.p.) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg, i.p.). Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para a realização do exame. Foi utilizado o equipamento modelo HDI-5000 da Philips, equipado com transdutor eletrônico multifrequencial de 5-12 MHz. Para avaliar as medidas estruturais do coração foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo-M) orientado pelas imagens em modo bidimensional, estando o transdutor em posição paraesternal eixo menor. A avaliação do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares.^{79,80} As imagens da aorta e do átrio esquerdo foram obtidas posicionando o cursor do modo-M ao nível do plano da valva aórtica. As imagens obtidas no modo-M foram registradas em impressora modelo UP-895 da Sony Co. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas, manualmente, com o auxílio de um paquímetro. As seguintes estruturas foram medidas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE; espessuras diastólica da parede posterior do VE (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV); e diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A espessura relativa do VE foi calculada dividindo o dobro da EDPP pelo DDVE $[(2 \times EDPP) / DDVE]$. A massa do VE (MVE) foi calculada pela fórmula $[(DDVE + EDPP + EDSIV)^3 - (DDVE)^3] \times 1,04$, onde 1,04 representa a densidade específica do miocárdio.^{80,81} A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico (% Δ endo) $[(DDVE - DSVE) / DDVE]$; 2) fração de ejeção (FE) $[(DDVE^3 - DSVE^3) / DDVE^3]$; 3) velocidade de

encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior. A função diastólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; 2) razão entre as ondas E e A (E/A); 3) tempo de desaceleração da onda E (TDE); 4) tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV); e 5) TRIV normalizado pela frequência cardíaca (TRIVn) $[\text{TRIV}/(\text{R-R})^{0,5}]$, onde R-R representa o intervalo entre dois ciclos cardíacos consecutivos.⁸²

3.4 Estudo do Músculo Isolado

A avaliação funcional do músculo isolado foi realizada dentro de 48 horas após a realização do ecocardiograma, de acordo com os procedimentos rotineiramente realizados em nosso laboratório.⁸³⁻⁸⁵ Sob anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.), os animais foram submetidos a toracotomia mediana. O coração foi rapidamente removido e colocado em solução de Krebs-Henseleit à temperatura de 28°C, previamente oxigenada por 10 minutos com 95% de oxigênio (O₂) e 5% de dióxido de carbono (CO₂). A composição da solução de Krebs-Henseleit,⁸⁶ em milimoles por litro, é: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 2,52 CaCl₂; 1,16 MgSO₄; 1,18 KH₂PO₄; 5,50 glicose e 25,88 NaHCO₃.

Após dissecação do ventrículo direito e corte no septo interventricular, o VE foi dividido em duas partes, cada uma contendo o seu músculo papilar e, em seguida, dissecados numa placa de vidro contendo solução descrita acima. Os músculos papilares, após terem as suas extremidades presas a anéis de aço inoxidável, foram rapidamente transferidos para câmara de vidro contendo solução

de Krebs-Henseleit, constantemente oxigenada com 95% de O₂ e 5% de CO₂ e mantida à temperatura de 28°C, graças ao uso de banho circulante.

Os músculos papilares foram mantidos em posição vertical na câmara de vidro. O anel inferior foi ligado a fio de aço inoxidável de 0,31 mm de diâmetro, conectado a transdutor de força (Kyowa 120T-20B), e o superior conectado a fio de aço, semelhante ao anterior, preso à extremidade do braço longo de uma alavanca isotônica. Sobre esta extremidade havia um micrômetro que controlava a extensão dos movimentos da alavanca permitindo ajustar o comprimento do músculo na fase de relaxamento muscular. O estiramento inicial da fibra cardíaca foi realizado com carga de pequeno peso (pré-carga) suspensa na extremidade do braço curto da alavanca, acoplado ao transdutor de comprimento (Hewlett Packard, modelo 7 DCDT-050).

Os músculos foram estimulados 12 vezes por minuto por meio de eletrodos de platina tipo agulha, acoplados a estimulador elétrico, programado para liberar estímulos em onda quadrada de 5 ms, com voltagem aproximadamente 10% maior que o mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo. Os músculos papilares foram estudados em contrações isométricas e registrados em um polígrafo. Os índices de contração avaliados foram: tensão desenvolvida máxima (TD); derivada positiva máxima de tensão desenvolvida (+dT/dt); e tempo para atingir o pico de tensão desenvolvida (TPT). O relaxamento muscular foi avaliado pelos índices derivada negativa máxima da tensão desenvolvida (-dT/dt) e tensão de repouso (TR).

O estudo funcional *in vitro* foi complementado por manobras que

aumentam a contratilidade miocárdica, com a finalidade de avaliar a reserva contrátil. Após período de estabilização, foi realizada a manobra de pós-pausa, a qual consiste em permitir que o músculo fique em repouso durante 30 segundos, e a primeira contração após esse período é analisada. Passados 5 minutos, foi trocada a solução nutriente de Krebs-Henseleit para outra com 2,5 mM de cálcio, estabilizada por 10 minutos e realizado o registro das contrações. A seguir, o músculo retornou a solução de 1,25 mM de cálcio, com período de estabilização de 10 minutos antes da adição de isoproterenol na concentração de 10^{-6} M. Dez minutos após a manobra era realizado novo registro das contrações.

3.5 Análise Histológica do Coração

Após a pesagem dos ventrículos direito e esquerdo, foram cortados fragmentos da parte central do VE, com 3 a 5 mm de espessura. O material foi imerso em formalina 10% neutra e tamponada durante 48 horas a 4°C. Após esse período, o tecido foi lavado, desidratado e incluído em parafina. Cortes histológicos de 5 a 7 μm de espessura foram submetidos à coloração por *picrosirius red* para quantificação da fração colágena miocárdica.

A análise morfométrica foi realizada utilizando-se uma câmara de vídeo acoplada a um microscópio Leica, com objetiva 40x, conectado a computador equipado com um programa analisador de imagem (Image-Pro Plus 3.0, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

Para avaliação do colágeno nas lâminas coradas por *picrosirius red*, foi

utilizada a videodensitometria. Retidas as imagens, os componentes do tecido cardíaco foram identificados, segundo o realce de cor. Os filamentos de colágeno refletiram a cor vermelha, enquanto os miócitos foram vistos na coloração amarela. Áreas contendo vasos sanguíneos foram excluídas da análise.

3.6 Análise de Variáveis Anatômicas

O grau de hipertrofia ventricular foi avaliado pelos pesos dos ventrículos direito e esquerdo em valores absolutos e normalizados pelo peso corporal dos animais. Após a retirada do coração do tórax, os átrios foram separados e fragmentos do pulmão e fígado foram coletados para determinação da relação peso úmido/peso seco desses órgãos.

3.7 Quantificação de Hidroxiprolina

A concentração de hidroxiprolina foi mensurada em tecido miocárdico obtido da ponta do VE, de acordo com o método descrito por Switzer,⁸⁷ utilizando-se a técnica previamente descrita em outros trabalhos de nosso laboratório.⁸⁸

Inicialmente foram obtidas as soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina (diluição 60 µl HOP / 2940 µl HCl) e a solução branca (água destilada). Previamente à execução do processamento bioquímico, foi necessária a preparação dos seguintes reagentes químicos: tampão borato 0,2 M (pH 8,7), tiosulfato de sódio

3,6 M e o reagente de Ehrlich.

O processamento bioquímico para determinação da concentração de hidroxiprolina foi iniciado por secagem das soluções-padrão e das amostras no concentrador de amostras (*Speed Vac*). A hidrólise ácida foi realizada mediante adição de HCl 6 N em cada um dos tubos das amostras, que foram aquecidas na estufa à 100°C por 8 horas. A oxidação foi realizada após retirada e resfriamento dos tubos da estufa. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 minutos e colocadas novamente no concentrador de amostras (*Speed Vac*) por 3 horas. Retiradas as amostras, foi adicionado em cada uma, 1 ml de água destilada e tamponadas com solução tampão borato 0,2 M pH 8,7; após 20 minutos, a reação foi inibida com a solução tiosulfato de sódio 3,6 M e as amostras foram agitadas. Posteriormente, a solução foi saturada com KCl e colocada em banho-maria a 90°C. Os tubos foram resfriados e neles adicionados 2,5 ml de tolueno; em seguida, foram agitados por 5 minutos para a separação das fases água e tolueno. Foram retirados 1,5 ml de tolueno da solução e estes foram colocados em tubos de hemólise para serem acrescentados 0,6 ml de solução de Ehrlich. As amostras foram mantidas em repouso por 30 minutos a fim de se alcançar a estabilidade do cromógeno. A leitura foi realizada por espectrofotometria com filtro de 565 nm.

3.8 Obtenção de Amostras para Avaliação do Estresse Oxidativo

O sangue foi coletado por decapitação sob anestesia, antes da retirada do coração para estudo do músculo papilar. O soro foi separado por centrifugação a 4.000 rpm por 15 minutos e utilizado para determinação da concentração de

hidroperóxido de lipídio e da atividade da glutathione peroxidase e superóxido dismutase.

Após obtenção de sangue e retirada dos músculos papilares, o coração foi imediatamente isolado e amostras do VE (aproximadamente 200 mg) foram estocadas à -80°C . Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,1 M) pH 7,4 e o homogeneizado centrifugado a 12.000 g, durante 15 minutos a -4°C .⁸⁹ O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de hidroperóxido de lipídio e atividade da glutathione peroxidase e superóxido dismutase.

3.8.1 Determinações Séricas e Cardíacas

3.8.1.1 Determinação de Hidroperóxido de Lipídio

Foi determinado através da oxidação do sulfato ferroso amoniacal (Fe^{2+}) na presença de alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato hidroxitolueno (BHT) em metanol à temperatura ambiente. O Fe^{3+} reage com o alaranjado de xilenol e forma cromógeno, cuja intensidade de coloração foi medida espectrofotometricamente.⁹⁰

3.8.1.2 Determinação da Atividade de Glutathione Peroxidase (GSH-Px)

A atividade da glutathione peroxidase foi determinada segundo método de Nakamura et al. na presença de peróxido de hidrogênio.⁹¹ A mistura de reação foi

preparada com tampão fosfato de sódio, NADPH₂, azida sódica, EDTA, glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona redutase. Através da oxidação do NADPH₂ a 340 nm na presença de glutathiona redutase, que catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG), determinou-se a atividade da GSH-Px.

3.8.1.3 Determinação da Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela técnica de Crouch et al, tendo como base a capacidade da enzima de inibir a redução do nitroblue-tetrazólico (NBT) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino, pH 10,0.⁹² A hidroxilamina gera fluxo de O₂⁻ do NBT para blue-formazana em temperatura ambiente. Quando a amostra é adicionada, a velocidade de redução do NBT é inibida, conforme a porcentagem de SOD presente na amostra.

3.9 Avaliação da Expressão Gênica das Proteínas Reguladoras do Trânsito de Cálcio no Miocárdio por RT-PCR em Tempo Real

A análise da expressão gênica das proteínas reguladoras do trânsito de cálcio no miocárdio (ATPase do Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático – SERCA-2a, fosfolamban – PLB e receptor de rianodina – RyR-2) e do gene constitutivo ciclofilina foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa, RT-PCR.⁹³

3.9.1 Extração de RNA com TRizol

O fragmento do miocárdio congelado foi homogeneizado em Polytron com TRizol (1ml de TRizol/50-100 mg de tecido). O homogenato foi transferido para tubo de 1,5 ml e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. A seguir, foram acrescentados 0,2 ml de clorofórmio por ml de TRizol utilizado, homogeneizado vigorosamente e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. Para a precipitação do RNA, a fase aquosa formada após a centrifugação do material foi separada e precipitada por intermédio de incubação com 0,5 ml de isopropanol (por ml de TRizol utilizado inicialmente) por 10 minutos, à temperatura ambiente. Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sedimento formado foi lavado com 1 ml de etanol 75% (por ml de TRizol utilizado inicialmente) e centrifugado a 7.500 g por 5 minutos a 4°C. O sedimento de RNA secou por 10 minutos à temperatura ambiente e foi ressuspenso em solução 0,01% de dietilpircarbonato (DEPC) e incubado a 60°C, por 10 minutos, para a inativação de possíveis resíduos de RNase. O RNA foi, então, quantificado por espectrofotometria a 260 nm, utilizando-se o fator de correção próprio para o RNA (40) e o fator de diluição do RNA (70). Foi também determinada, por espectrofotometria, a razão entre 260 e 280 nm, o que fornece uma estimativa da qualidade do processo de extração.

3.9.2 Gel Analítico de Agarose para RNA

Para analisar a integridade do RNA, foi realizada eletroforese (1 µl da solução contendo o RNA total, 1 µl de carregador *Orange* e 8 µl de água ultra-pura) em gel de agarose (1%), tampão TAE (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM), corado com brometo de etídio, à voltagem de 60 mV.

3.9.3 Transcrição Reversa (RT) do RNA

A RT do RNA de cada amostra foi realizada utilizando-se os componentes do *Kit SuperScript First-Strand Synthesis for RT-PCR* (Invitrogen, Brasil). Uma mistura contendo 1 µg de RNA total, 1 µl de dNTP mix 10 mM e 1 µl de Random Hexamers (50 ng/µl), com volume total ajustado para 10 µl de H₂O tratada com DEPC, foi incubada por 5 minutos a 65°C. A seguir, foram adicionados a essa mistura 9 µl de uma solução contendo 2 µl de tampão RT 10x, 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de DTT 0,1 M e 1 µl de inibidor de RNase recombinante RNaseOUT™ (40 unidades/µl). Após leve agitação e incubação a 42°C por 2 minutos, foi adicionado à reação 1 µl da enzima *SuperScript™ II RT* (50 unidades/µl) e a mistura foi novamente incubada por 50 minutos a 42°C. Em seguida, a mistura de reação foi colocada no gelo e adicionado 1 µl de RNase H para finalmente incubar essa mistura por 20 minutos a 37°C.

Para comprovar a ausência de DNA genômico residual nas amostras de RNA submetidas à reação de RT, uma amostra de RNA (controle negativo da RT) foi submetida à reação de RT acima descrita com a substituição da enzima

SuperScript™ II RT por 1 µl de H₂O com DEPC. Esse produto de reação foi utilizado em todas as reações de PCR e a ausência de DNA genômico residual foi confirmada pela ausência de produtos de amplificação.

3.9.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real

Alíquotas da reação de RT de cada amostra contendo 10 – 100 ng de cDNA foram adicionadas a uma mistura contendo 10 µl *2X TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 1 µl de ensaio pré-otimizado (20X) contendo sonda *FAM dye-labeled Taqman MGB* e primers “sense” e “antisense” não marcados (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) específicos para cada gene. Foi adicionada água tratada com DEPC para se obter um volume final de 20 µl. As reações foram realizadas em triplicata para cada gene alvo e para o gene constitutivo no sistema *Real Time PCR 7500* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo protocolo sugerido pelo fabricante: 1 ciclo a 95°C por 10 minutos para ativação da *AmpliTaq Gold Enzyme*; 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos) e anelamento-extensão (60°C por 1 minuto). Para cada amostra foi “plotado” um gráfico de amplificação mostrando aumento do *reporter dye* fluorescente em cada ciclo da PCR. A partir desse gráfico, foi determinado o ciclo em que a reação atinge o limiar de detecção (*critical threshold cycle - C_T*), baseado na variabilidade dos dados da linha de base obtidos a partir dos ciclos iniciais da PCR. Os *primers* para os genes analisados (Quadro 1) foram obtidos através do *software Primer Express*® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), a partir de sequências publicadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>).

A quantificação relativa de cada gene, normalizada pela referência endógena (ciclofilina), foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Quadro 1. Ensaio utilizado na PCR em tempo real

Gene	Ensaio	Genbank
SERCA- 2a	Rn00568762_m1	NM_01729.0
PLB	Rn01434045_m1	NM_022707.1
RyR-2	Rn01470303_m1	AF_112257.1
Ciclofilina	Rn00690933_m1	NM_017101.1

SERCA-2a: ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático; PLB: fosfolamban; RyR-2: receptor rianodina; Ciclofilina: gene constitutivo.

3.10 Análise Estatística

Os dados numéricos são expostos como média \pm desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75 de acordo com a distribuição normal ou não normal. Para as comparações entre os grupos foi utilizada a técnica da análise de variância (ANOVA) complementados por cálculos ou testes recomendados para o esquema fatorial 2 X 2, de acordo com a distribuição probabilística.⁹⁴ As comparações consideradas de interesse entre os quatro grupos foram: CTL x QC; CTL x DM; QC x DM+QC; e DM x DM+QC. Todas as conclusões estatísticas foram discutidas no nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1 Caracterização da Amostra Quanto ao Peso Corporal, Glicemia e Pressão Arterial Sistólica

Neste estudo foram utilizados 120 ratos Wistar machos com peso corporal (PC) inicial de 326 ± 2 g. O grupo CTL era constituído de 24 ratos, sendo que cinco foram a óbito. No grupo QC havia 29 ratos no início do experimento, e oito morreram no decorrer do experimento. O grupo DM era composto por 35 animais, no entanto quatro não ficaram diabéticos e sete morreram. Já no grupo DM+QC, que contava com 32 ratos, cinco não ficaram diabéticos e oito morreram. Portanto, o número final de animais em cada grupo experimental foi de 19 no CTL, 21 no QC, 24 no DM e 19 no DM+QC.

Os valores de PC e glicemia, iniciais e finais, assim como da pressão arterial sistólica dos quatro grupos experimentais, estão apresentados na Tabela 1.

Não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao PC inicial entre os grupos. O PC final apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo menor no grupo DM em relação ao CTL, e menor no grupo DM+QC em relação ao grupo QC (Gráfico 1).

A glicemia inicial dos animais não apresentou diferença significativa entre os grupos. A glicemia final foi maior nos animais diabéticos em relação ao grupo CTL e nos diabéticos que receberam quercetina em relação ao grupo QC. Apesar do grupo DM+QC apresentar mediana de glicemia final inferior em relação ao grupo DM, essa diferença não apresentou relevância estatística (Gráfico 2).

A pressão arterial sistólica, medida ao final do período experimental, não foi estatisticamente diferente entre os grupos.

Tabela 1. Peso corporal, glicemia e pressão arterial sistólica dos animais

Variável	CTL (n=19)	QC (n=21)	DM (n=24)	DM+QC (n=19)
PCI (g)	325 ± 27	326 ± 24	329 ± 22	326 ± 24
PCF (g)	433 ± 32	421 ± 42 †	283 ± 49 *	307 ± 55
GI (mg/dL)	112 (103 - 116)	103 (97,0 - 110)	113 (102 - 119)	104 (101 - 118)
GF (mg/dL)	87,5 (79,0 - 92,0)	82,0 (77,0 - 92,5) †	396 (370 - 448) *	363 (284 - 419)
PAS (mmHg)	133 ± 15	131 ± 10	138 ± 11	143 ± 10

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; GI: glicemia inicial; GF: glicemia final; PAS: pressão arterial sistólica; *: p<0,05 vs. CTL; †: p<0,05 vs. DM+QC (ANOVA, esquema fatorial 2X2).

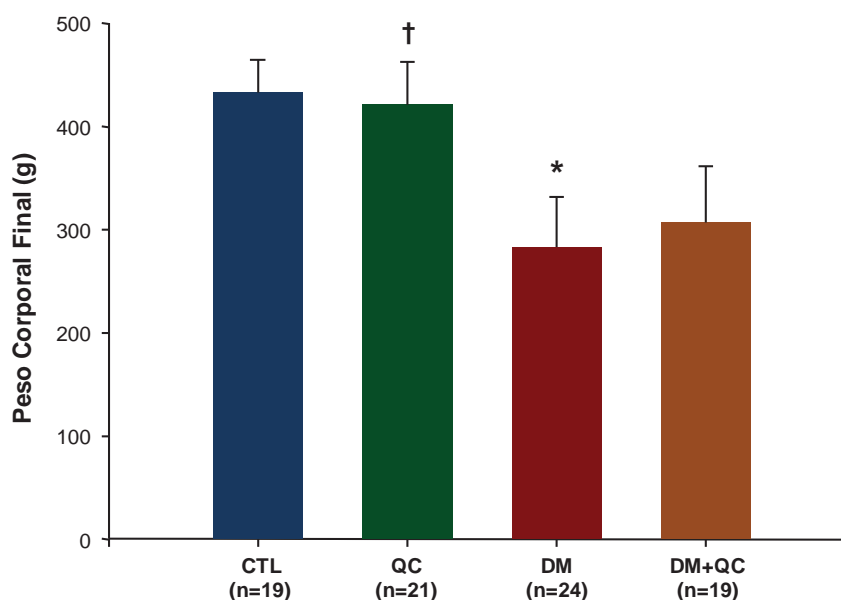


Gráfico 1: Peso corporal dos animais ao final do experimento. CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: p<0,05 vs. CTL; †: p<0,05 vs. DM+QC.

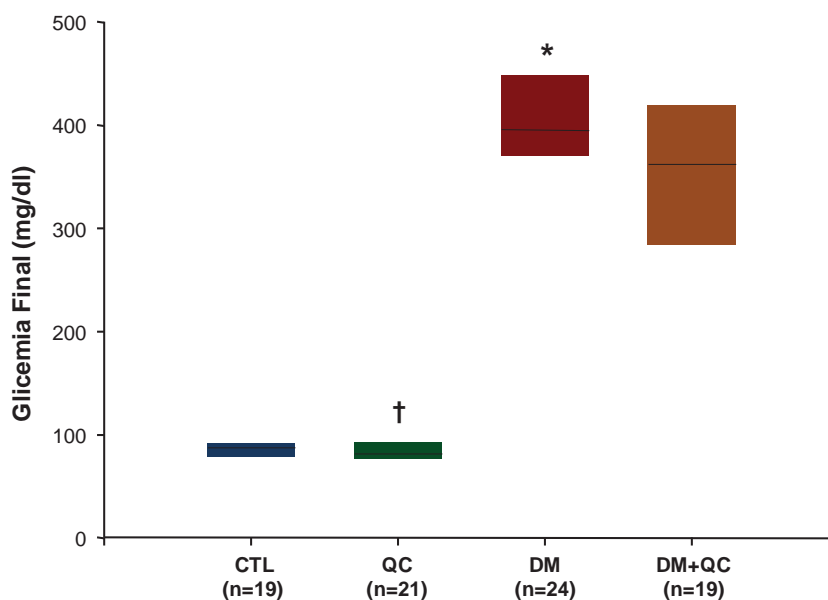


Gráfico 2: Glicemia ao final do experimento. CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: $p < 0,05$ vs. CTL; †: $p < 0,05$ vs. DM+QC.

4.2 Avaliação Ecocardiográfica

A Tabela 2 apresenta as variáveis estruturais cardíacas relativas ao ecocardiograma dos animais. O grupo DM apresentou as variáveis DDVE/PC, AE/PC, MVE/PC estatisticamente maiores em relação ao grupo CTL. Da mesma forma, o grupo DM+QC apresentou valores de DDVE/PC e MVE/PC significativamente maiores em relação ao grupo QC (Gráficos 3 e 5). No entanto, a variável AE/PC, no grupo DM+QC, apresentou valor intermediário entre os grupos DM e QC, havendo diferença significativa com ambos (Gráfico 4); assim a quercetina

atenuou a elevação desta variável. As variáveis EDPP, EDSIV, AO e MVE foram menores nos grupos diabéticos DM e DMQC em relação aos respectivos grupos CTL e QC. A FC, DDVE, DSVE, AE e a espessura relativa do VE não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Tabela 2. Variáveis estruturais do coração obtidas por ecocardiograma ao final do período experimental

Variável	CTL (n=19)	QC (n=21)	DM (n=24)	DM+QC (n=19)
FC (bpm)	305 (277 - 399)	294 (280 - 363)	315 (279 - 351)	276 (265 - 297)
DDVE (mm)	8,13 ± 0,79	8,09 ± 0,76	7,74 ± 0,60	7,81 ± 0,73
DDVE/PC (mm/Kg)	18,7 (17,7 - 20,2)	18,9 (18,3 - 20) †	26,7 (24,3 - 30,6) *	26,0 (22,8 - 28,7)
DSVE (mm)	4,12 ± 0,71	4,21 ± 0,64	4,29 ± 0,74	4,16 ± 0,61
EDPP (mm)	1,43 (1,35 - 1,53)	1,39 (1,35 - 1,45) †	1,31 (1,27 - 1,35) *	1,35 (1,28 - 1,39)
EDSIV (mm)	1,47 (1,39 - 1,55)	1,39 (1,35 - 1,45) †	1,32 (1,28 - 1,37) *	1,35 (1,31 - 1,39)
AO (mm)	3,90 (3,73 - 4,20)	3,90 (3,70 - 4,03) †	3,70 (3,40 - 3,85) *	3,70 (3,50 - 3,88)
AE (mm)	5,67 ± 0,62	5,70 ± 0,77	5,68 ± 0,67	5,45 ± 0,71
AE/PC (mm/Kg)	13,1 ± 1,15	13,6 ± 2,25 †	20,6 ± 3,97 *†	18,1 ± 2,59
MVE (g)	0,85 ± 0,16	0,81 ± 0,14 †	0,70 ± 0,12 *	0,72 ± 0,14
MVE/PC (g/Kg)	1,96 ± 0,31	1,92 ± 0,32 †	2,49 ± 0,40 *	2,37 ± 0,44
Esp. Rel. VE	0,36 ± 0,05	0,35 ± 0,04	0,35 ± 0,03	0,35 ± 0,04

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; FC: frequência cardíaca; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); PC: peso corporal; DSVE: diâmetro sistólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; MVE: massa do VE; Esp. Rel. VE: espessura relativa do VE; *: p<0,05 vs. CTL; †: p<0,05 vs. DM+QC (ANOVA, esquema fatorial 2X2).

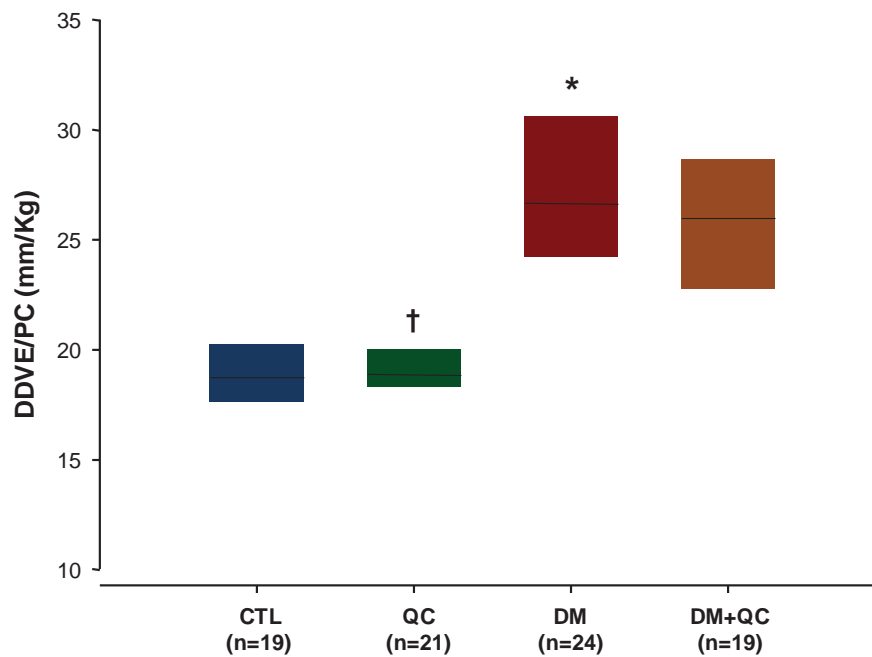


Gráfico 3: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corporal (DDVE/PC). CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: $p < 0,05$ vs. CTL; †: $p < 0,05$ vs. DM+QC.

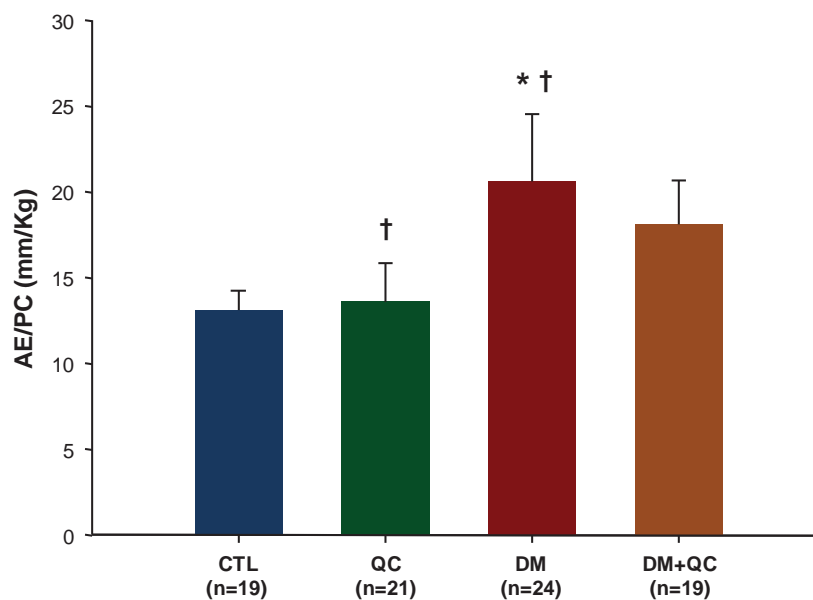


Gráfico 4: Diâmetro do átrio esquerdo normalizado pelo peso corporal (AE/PC). CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: $p < 0,05$ vs. CTL; †: $p < 0,05$ vs. DM+QC.

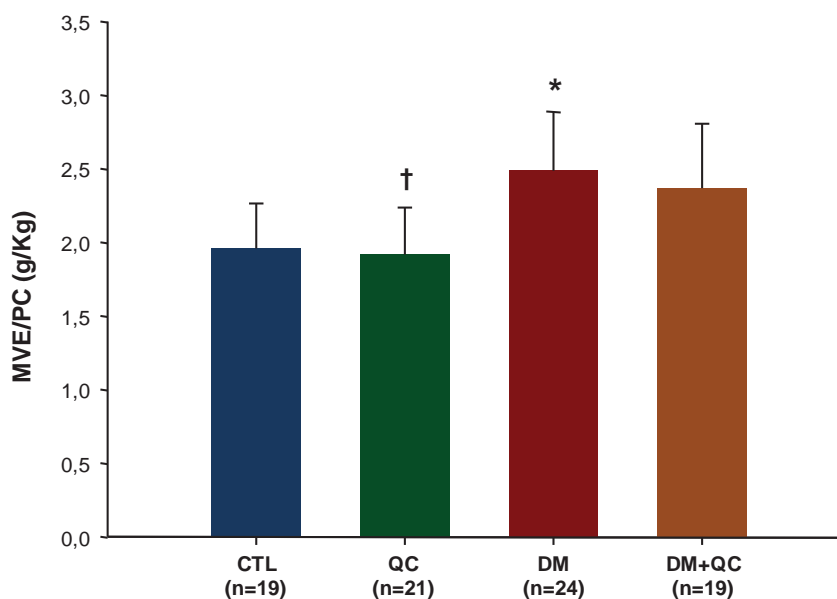


Gráfico 5: Massa do ventrículo esquerdo normalizada pelo peso corporal (MVE/PC). CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: $p < 0,05$ vs. CTL; †: $p < 0,05$ vs. DM+QC.

Os resultados da avaliação funcional do VE, avaliado por meio de ecocardiograma, estão expostos na Tabela 3. Em relação à função sistólica, avaliada pela porcentagem de encurtamento endocárdico (Gráfico 6), fração de ejeção (Gráfico 7) e a velocidade de encurtamento da parede posterior foram menores no grupo DM em relação ao grupo CTL. A velocidade de encurtamento da parede posterior foi significativamente menor no grupo DM+QC quando comparado ao grupo QC. A avaliação da função diastólica mostrou que o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) assim como TRIV normalizado pela frequência cardíaca (TRIVn) (Gráfico 8) foram estatisticamente maiores no grupo DM e grupo DM+QC em relação ao grupo CTL e grupo QC, respectivamente. Os valores da onda E, onda A, razão entre as ondas E e A e o tempo de desaceleração da onda E (TDE) não diferiram entre os grupos.

Tabela 3. Variáveis funcionais do ventrículo esquerdo obtidas por ecocardiograma ao final do período experimental

Variável	CTL (n=19)	QC (n=21)	DM (n=24)	DM+QC (n=19)
%Δ endo	49,6 ± 5,72	48,1 ± 4,90	44,8 ± 6,96 *	46,8 ± 4,75
FE	0,87 ± 0,04	0,86 ± 0,04	0,82 ± 0,06 *	0,85 ± 0,04
VEPP (mm/s)	37,1 (33,7 - 41,4)	38,1 (36,5 - 40,9) †	30,3 (27,3 - 33,8) *	31,4 (25,7 - 35,1)
Onda E (cm/s)	82,9 ± 15,3	81,6 ± 13,2	86,3 ± 13,4	80,2 ± 12,6
Onda A (cm/s)	58,8 ± 17,5	61,0 ± 18,9	69,3 ± 13,4	66,9 ± 15,2
E/A	1,35 (1,19 - 1,72)	1,50 (1,13 - 1,57)	1,23 (1,18 - 1,33)	1,18 (1,09 - 1,41)
TRIV (ms)	28,2 ± 5,16	27,4 ± 3,94 †	34,6 ± 5,08 *	37,3 ± 5,18
TRIVn (ms)	64,0 ± 8,61	63,7 ± 10,2 †	78,6 ± 9,62 *	80,9 ± 8,36
TDE (ms)	51,0 (42,0 - 54,8)	45,0 (39,0 - 53,3)	48,0 (38,3 - 54,0)	54,0 (42,0 - 56,3)

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; %Δ endo: porcentagem de encurtamento endocárdico do VE; FE: fração de ejeção; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE; E/A: razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TRIVn: TRIV normalizado pela frequência cardíaca; TDE: tempo de desaceleração da onda E; *: p<0,05 vs. CTL; †: p<0,05 vs. DM+QC (ANOVA, esquema fatorial 2X2).

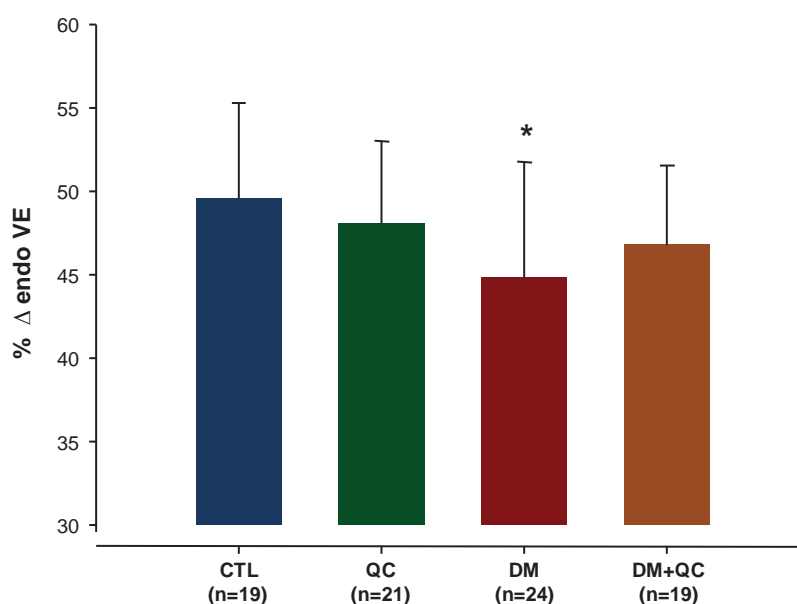


Gráfico 6: Porcentagem de encurtamento endocárdico do ventrículo esquerdo (%Δ endo). CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: p<0,05 vs. CTL.

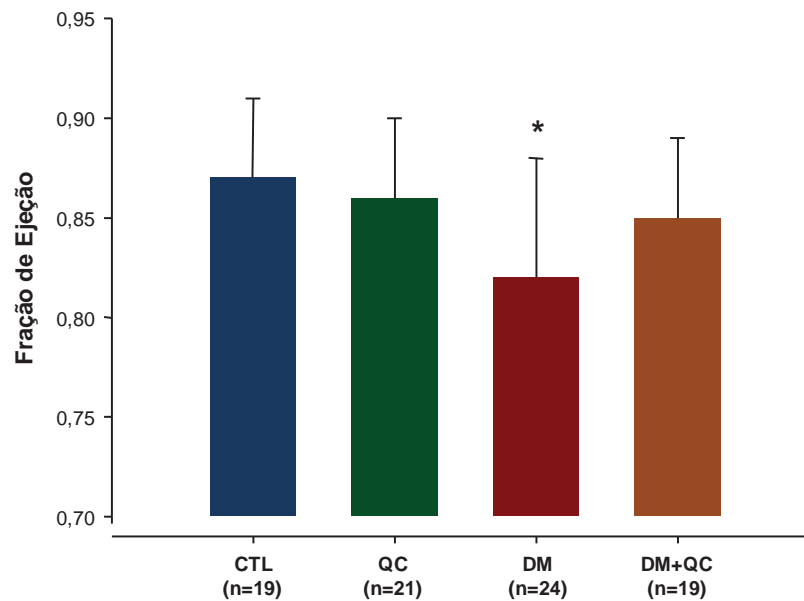


Gráfico 7: Fração de ejeção do ventrículo esquerdo. CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: $p < 0,05$ vs. CTL.

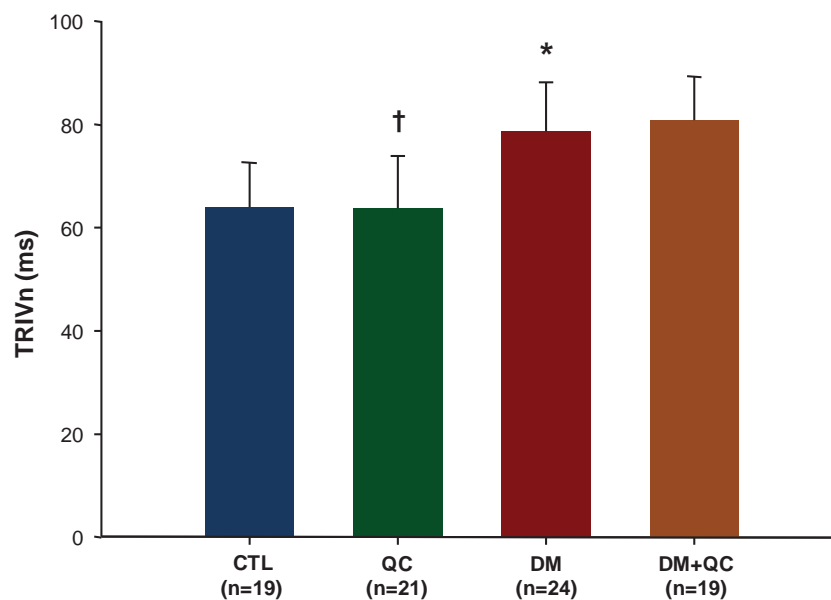


Gráfico 8: Tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela frequência cardíaca (TRIVn). CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: $p < 0,05$ vs. CTL; †: $p < 0,05$ vs. DM+QC.

4.3 Estudo Funcional do Músculo Papilar

4.3.1 Condição Basal

Os resultados obtidos do estudo funcional do músculo papilar estão apresentados na Tabela 4. A tensão desenvolvida máxima (TD) foi menor no grupo DM quando comparado com o grupo CTL, e a quercetina foi capaz de evitar a redução desse índice de contratilidade no grupo DM+QC (Gráfico 9).

O tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida (TPT) foi maior nos grupos QC e DM em relação ao grupo CTL, e apresentou-se ainda maior no grupo DM+QC em relação aos grupos QC e DM.

Tabela 4. Variáveis funcionais do músculo isolado obtidas em contrações isométricas na condição basal

Variável	CTL (n=11)	QC (n=17)	DM (n=19)	DM+QC (n=15)
TD (g/mm ²)	5,31 ± 1,36	5,31 ± 1,52	3,89 ± 1,31 * †	5,00 ± 1,01
TPT (ms)	204 ± 16	226 ± 24 * †	252 ± 24 * †	279 ± 17
+dT/dt (g/mm ² /s)	49,8 ± 13,8	46,2 ± 13,6 †	29,7 ± 10,3 *	35,2 ± 7,57
-dT/dt (g/mm ² /s)	18,0 (16,1 - 21,5)	16,5 (12,9 - 20,9)	12,2 (10,7 - 15,7) *	14,0 (12,3 - 15,6)
TR (g/mm ²)	0,58 (0,50 - 0,84)	0,77 (0,52 - 0,99)	0,57 (0,45 - 0,77) †	0,79 (0,67 - 1,06)

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; TD: tensão desenvolvida máxima; TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de queda da tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso; *: p<0,05 vs. CTL; †: p<0,05 vs. DM+QC (ANOVA, esquema fatorial 2X2).

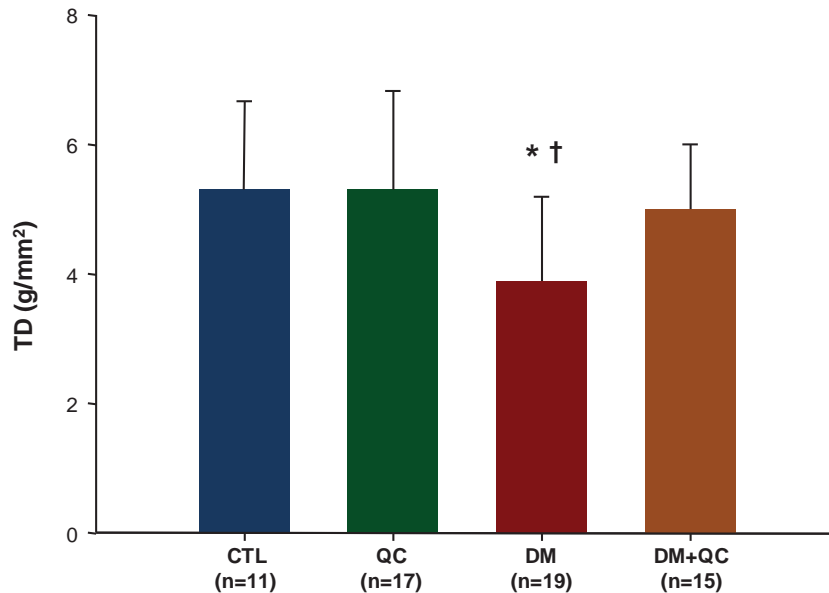


Gráfico 9: Tensão desenvolvida máxima (TD). CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: $p < 0,05$ vs. CTL; †: $p < 0,05$ vs. DM+QC.

As velocidades máximas de elevação e decréscimo da TD (+dT/dt e -dT/dt, respectivamente) foram menores no grupo DM em relação ao grupo CTL, e a quercetina não melhorou significativamente esses índices (Gráficos 10 e 11). Quanto à tensão de repouso (TR), a quercetina causou aumento desse índice em animais diabéticos, no entanto não foi observada diferença entre eles e o grupo que recebeu somente quercetina.

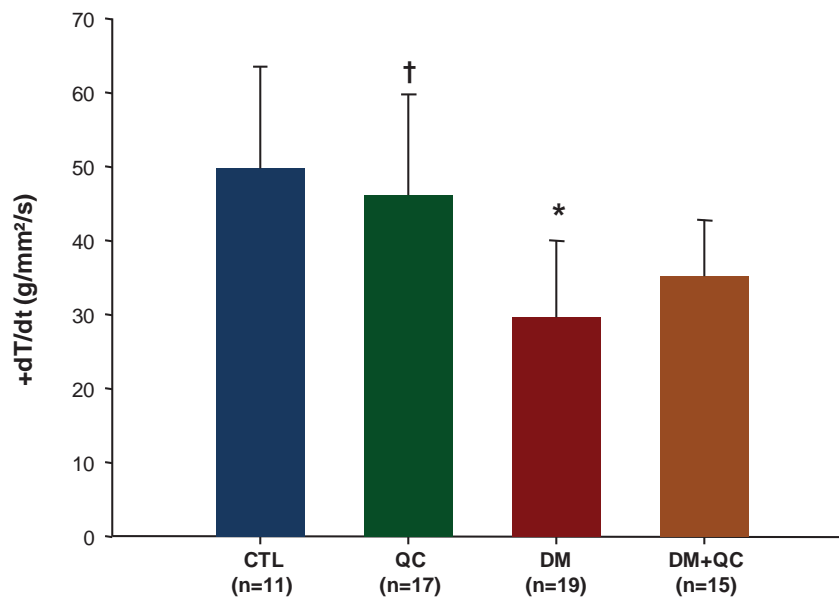


Gráfico 10: Velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida (+dT/dt). CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: $p < 0,05$ vs. CTL; †: $p < 0,05$ vs. DM+QC.

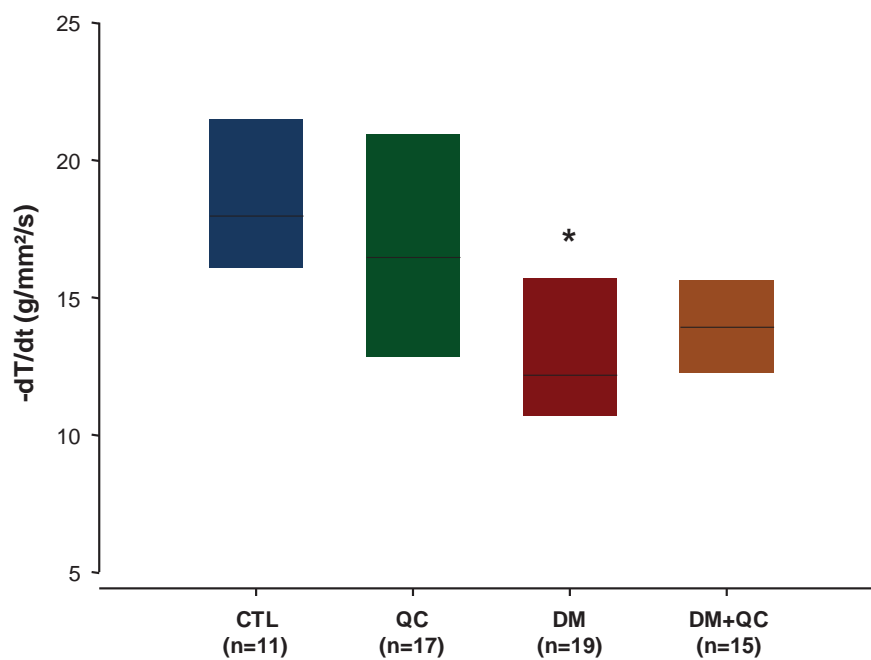


Gráfico 11: Velocidade máxima de queda da tensão desenvolvida (-dT/dt). CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: $p < 0,05$ vs. CTL.

4.3.2 Manobras Inotrópicas

Na Tabela 5 estão apresentadas as variáveis funcionais do estudo do músculo papilar obtidas sob ação de manobras inotrópicas positivas. Foram realizadas três manobras: pós-pausa de 30 segundos, elevação da concentração extracelular de cálcio de 1,25 mM para 2,5 mM e adição de isoproterenol 10^{-6} M.

Em todas as manobras realizadas, a tensão desenvolvida (TD) foi estatisticamente menor no grupo DM em relação ao grupo CTL. Nas manobras de pós pausa e de elevação da concentração extracelular de cálcio, a TD foi maior no grupo DM+QC em relação ao grupo DM, e sem diferença em relação ao grupo QC. À adição de isoproterenol, o valor de TD do grupo DM+QC ficou entre os valores dos grupos DM e QC e não apresentou diferença significativa em relação a esses grupos.

Nas três manobras o TPT foi maior no grupo DM em relação ao CTL. Nas manobras de pós pausa e de elevação da concentração extracelular de cálcio, a quercetina prolongou o TPT nos animais diabéticos e não diabéticos. À adição de isoproterenol, o TPT foi maior nos animais diabéticos que receberam quercetina em relação ao grupo QC.

Em todas as manobras realizadas, a $+dT/dt$ e a $-dT/dt$ foram menores no grupo DM e no grupo DM+QC em relação ao grupo CTL e QC, respectivamente, exceto que na manobra de elevação da concentração extracelular de cálcio o grupo DM+QC apresentou $-dT/dt$ maior em relação ao grupo DM. Nas demais manobras, tanto a $-dT/dt$ como a $+dT/dt$, embora apresentassem valores maiores no grupo DM+QC em relação ao grupo DM, essas diferenças não foram estatisticamente

significantes.

O valor da TR foi significativamente maior no grupo DM+QC em relação ao grupo DM apenas na manobra de pós pausa.

Tabela 5. Variáveis funcionais do músculo isolado obtidas em contrações isométricas sob manobras inotrópicas positivas

	Variável	CTL (n=11)	QC (n=17)	DM (n=19)	DM+QC (n=15)
PP30	TD (g/mm ²)	6,56 ± 1,84	6,74 ± 1,59	4,39 ± 1,60 * †	5,69 ± 1,18
	TPT (ms)	215 ± 14	232 ± 25 †	261 ± 22 * †	289 ± 24
	+dT/dt (g/mm ² /s)	61,1 ± 18,5	60,4 ± 14,2 †	33,1 ± 12,9 *	39,6 ± 8,95
	-dT/dt (g/mm ² /s)	18,8 ± 3,29	19,3 ± 4,43 †	12,7 ± 3,50 *	14,1 ± 2,02
	TR (g/mm ²)	0,57 (0,55 - 0,84)	0,75 (0,58 - 1,08)	0,60 (0,43 - 0,79) †	0,93 (0,77 - 1,24)
[Ca ²⁺] _o 2,5 mM	TD (g/mm ²)	6,49 ± 1,70	6,58 ± 1,54	4,31 ± 1,43 * †	5,44 ± 1,23
	TPT (ms)	189 ± 15	201 ± 20 †	232 ± 20 * †	251 ± 19
	+dT/dt (g/mm ² /s)	66,0 ± 18,5	65,2 ± 15,5 †	36,5 ± 13,6 *	43,3 ± 11,8
	-dT/dt (g/mm ² /s)	21,4 ± 3,93	23,0 ± 5,96 †	13,9 ± 3,44 * †	17,1 ± 3,65
	TR (g/mm ²)	0,52 (0,39 - 0,73)	0,55 (0,40 - 0,80)	0,52 (0,35 - 0,67)	0,63 (0,53 - 0,70)
Iso 10 ⁻⁶ M	TD (g/mm ²)	6,13 ± 1,77	5,97 ± 2,10	4,02 ± 1,30 *	5,04 ± 1,15
	TPT (ms)	160 (140 - 160)	160 (140 - 180) †	200 (190 - 200) *	200 (200 - 220)
	+dT/dt (g/mm ² /s)	70,9 ± 19,6	70,1 ± 24,0 †	39,6 ± 13,7 *	45,9 ± 12,0
	-dT/dt (g/mm ² /s)	34,8 ± 5,86	36,8 ± 12,8 †	20,1 ± 5,08 *	23,6 ± 5,55
	TR (g/mm ²)	0,52 ± 0,22	0,47 ± 0,24	0,42 ± 0,20	0,51 ± 0,14

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético que recebeu quercetina; PP30: pós pausa de 30 segundos; [Ca²⁺]_o: concentração extracelular de cálcio; Iso: isoproterenol; TD: tensão desenvolvida máxima; TPT: tempo para atingir o pico de tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de queda da tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso; *: p<0,05 vs. CTL; †: p<0,05 vs. DM+QC (ANOVA, esquema fatorial 2X2).

4.4 Variáveis Anatômicas

Na Tabela 6 são mostradas as variáveis anatômicas dos animais dos grupos estudados. Os pesos do VE e ventrículo direito (VD) foram inferiores nos animais dos grupos DM e DMQC em relação aos animais do grupo CTL e QC, respectivamente. No entanto, os pesos do VE, VD e átrios normalizados pelo PC foram maiores nos animais dos grupos DM e DM+QC em relação aos respectivos grupos controles. O peso absoluto dos átrios não foi estatisticamente diferente entre os grupos. Os valores das razões entre os pesos úmido e seco do VE, VD, átrios, pulmão e fígado não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4.5 Concentração de Hidroxiprolina e Fração Colágena Intersticial Miocárdica

A concentração de hidroxiprolina em amostras do VE dos animais foi maior nos grupos DM e DM+QC em relação aos grupos CTL e QC, respectivamente (Tabela 7 e Gráfico 12).

Em relação à avaliação da fração de colágeno intersticial no miocárdio do VE, não observamos diferença significativa entre os grupos (Tabela 7).

Tabela 6. Variáveis anatômicas dos animais

Variável	CTL (n=18)	QC (n=21)	DM (n=24)	DM+QC (n=18)
VE (g)	0,65 (0,60 - 0,74)	0,60 (0,59 - 0,70) †	0,54 (0,51 - 0,58) *	0,54 (0,50 - 0,62)
VE/PC (g/kg)	1,59 (1,51 - 1,70)	1,62 (1,50 - 1,81) †	2,09 (1,89 - 2,28) *	2,00 (1,87 - 2,27)
VD (g)	0,20 (0,18 - 0,25)	0,19 (0,17 - 0,21) †	0,18 (0,16 - 0,20) *	0,16 (0,15 - 0,18)
VD/PC (g/kg)	0,50 (0,44 - 0,58)	0,50 (0,45 - 0,56) †	0,68 (0,61 - 0,81) *	0,63 (0,58 - 0,68)
Átrios (g)	0,072 ± 0,021	0,069 ± 0,017	0,060 ± 0,019	0,066 ± 0,020
Átrios/PC (g/kg)	0,18 (0,15 - 0,21)	0,18 (0,17 - 0,20) †	0,25 (0,20 - 0,31) *	0,24 (0,22 - 0,31)
VE úmido/seco	3,60 (3,27 - 4,00)	3,27 (1,70 - 3,77)	3,25 (2,79 - 3,57)	4,07 (2,82 - 4,78)
VD úmido/seco	3,75 (3,45 - 4,23)	3,77 (2,33 - 4,20)	3,71 (3,26 - 3,87)	3,50 (2,56 - 4,37)
Átrios úmido/seco	4,34 (3,61 - 4,57)	4,08 (3,84 - 4,37)	4,25 (3,25 - 4,59)	4,29 (3,89 - 4,86)
Pulmão úmido/seco	4,52 (4,42 - 4,68)	4,53 (4,36 - 4,61)	4,51 (4,40 - 4,61)	4,52 (4,23 - 4,67)
Fígado úmido/seco	3,33 (3,25 - 3,40)	3,25 (3,15 - 3,35)	3,21 (3,00 - 3,34)	3,27 (3,13 - 3,44)

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; VE: ventrículo esquerdo; PC: peso corporal; VD: ventrículo direito; *: $p < 0,05$ vs. CTL; †: $p < 0,05$ vs. DM+QC (ANOVA, esquema fatorial 2X2).

Tabela 7. Concentração de hidroxiprolina e fração colágena intersticial no miocárdio do ventrículo esquerdo

Variável	CTL	QC	DM	DM+QC
HOP VE (mg/g)	2,43 ± 0,40	2,62 ± 0,25 †	2,92 ± 0,25 *	3,04 ± 0,44
FCI VE (%)	1,82 ± 0,96	1,91 ± 0,80	2,23 ± 1,07	2,17 ± 1,09
FCI Papilar (%)	1,47 ± 0,80	2,09 ± 0,51	2,52 ± 1,06	2,13 ± 1,12

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina. HOP VE: concentração de hidroxiprolina no miocárdio do ventrículo esquerdo; FCI: fração de colágeno intersticial; *: $p < 0,05$ vs. CTL; †: $p < 0,05$ vs. DM+QC (ANOVA, esquema fatorial 2X2). Obs.: para avaliação da HOP VE foram utilizados 9, 9, 10 e 9 animais, e para FCI 5, 6, 6 e 6 animais nos respectivos grupos CTL, QC, DM e DM+QC.

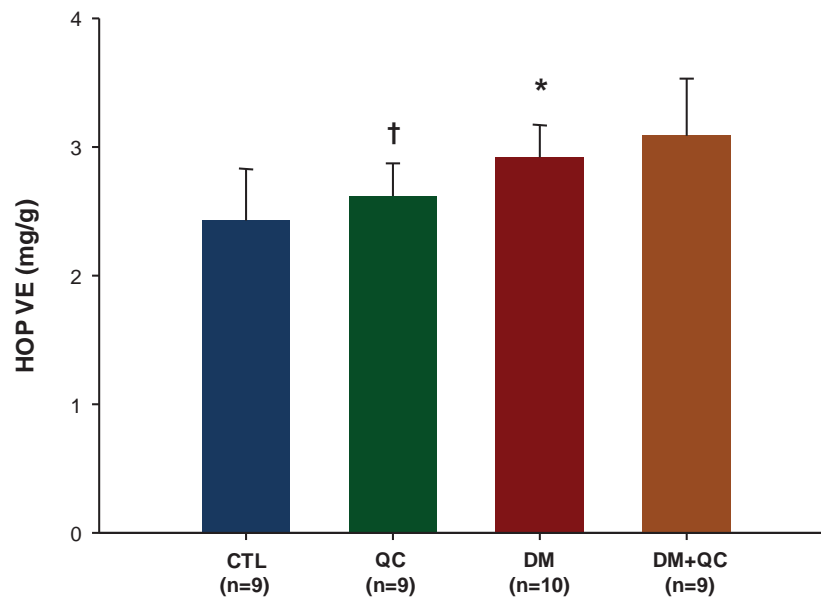


Gráfico 12: Concentração de hidroxiprolina no miocárdio do ventrículo esquerdo (HOP VE). CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: $p < 0,05$ vs. CTL; †: $p < 0,05$ vs. DM+QC.

4.6 Avaliação do Estresse Oxidativo

Na Tabela 8 estão apresentados os valores obtidos da avaliação do estresse oxidativo no soro dos animais. O hidroperóxido de lipídio estava mais elevado nos grupos diabéticos, e a quercetina atenuou a elevação considerando que o valor observado situou-se entre os dos grupos DM e QC, havendo diferença com ambos os grupos (Gráfico 13). Em relação às enzimas antioxidantes, nos animais do grupo DM houve menor concentração de superóxido dismutase e glutatona peroxidase em relação ao grupo CTL, e a quercetina evitou a redução dos níveis dessas enzimas (Gráficos 14 e 15).

Tabela 8. Avaliação do estresse oxidativo no soro

Variável	CTL (n=8)	QC (n=8)	DM (n=8)	DM+QC (n=8)
Hidroperóxido de lipídio (nmol/ml)	8,81 ± 0,90	9,15 ± 0,64 †	12,3 ± 0,66 * †	11,1 ± 0,71
Superóxido dismutase (U/g proteína)	487 ± 105	518 ± 43	297 ± 100 * †	581 ± 43
Glutaciona peroxidase (nmol/ml)	21,1 ± 4,09	22,3 ± 4,06	13,4 ± 3,22 * †	22,8 ± 5,86

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: p<0,05 vs. CTL; †: p<0,05 vs. DM+QC (ANOVA, esquema fatorial 2X2).

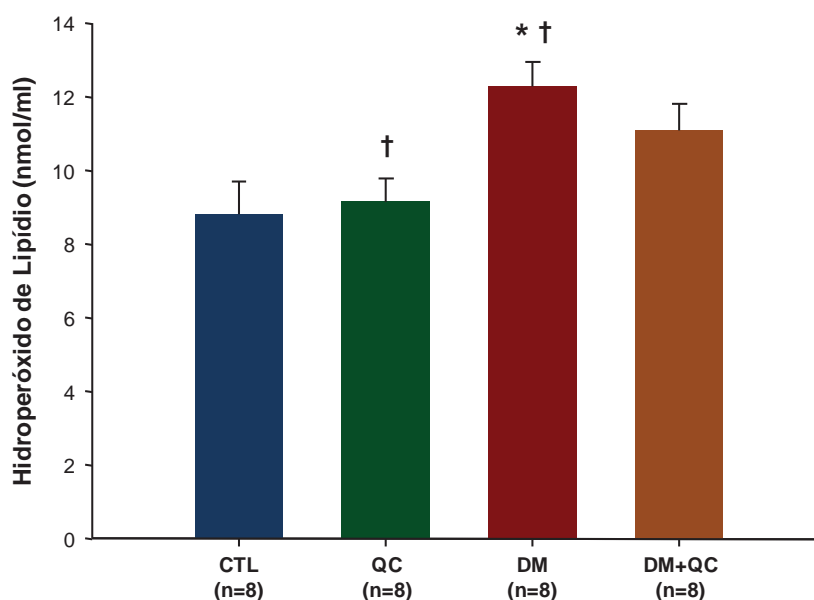


Gráfico 13: Concentração de hidroperóxido de lipídio no soro. CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: p<0,05 vs. CTL; †: p<0,05 vs. DM+QC.

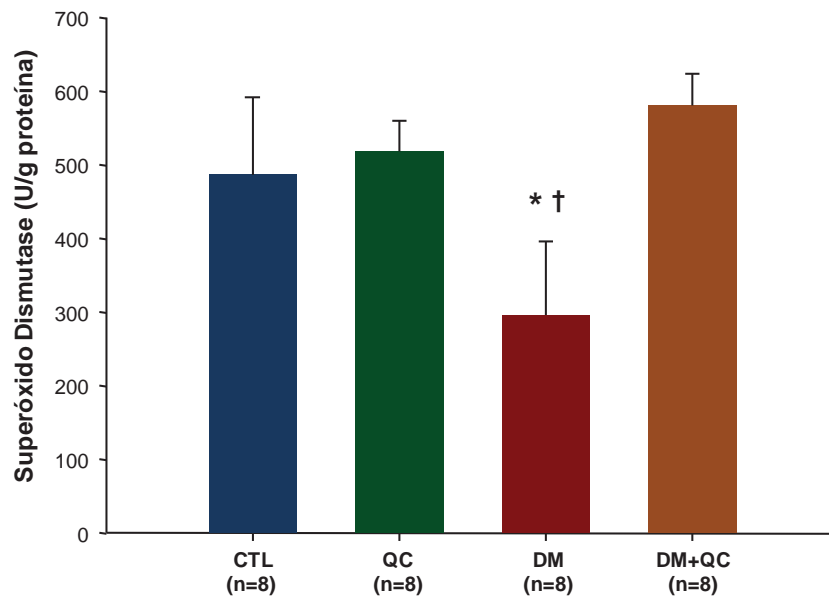


Gráfico 14: Concentração de superóxido dismutase no soro. CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: $p < 0,05$ vs. CTL; †: $p < 0,05$ vs. DM+QC.

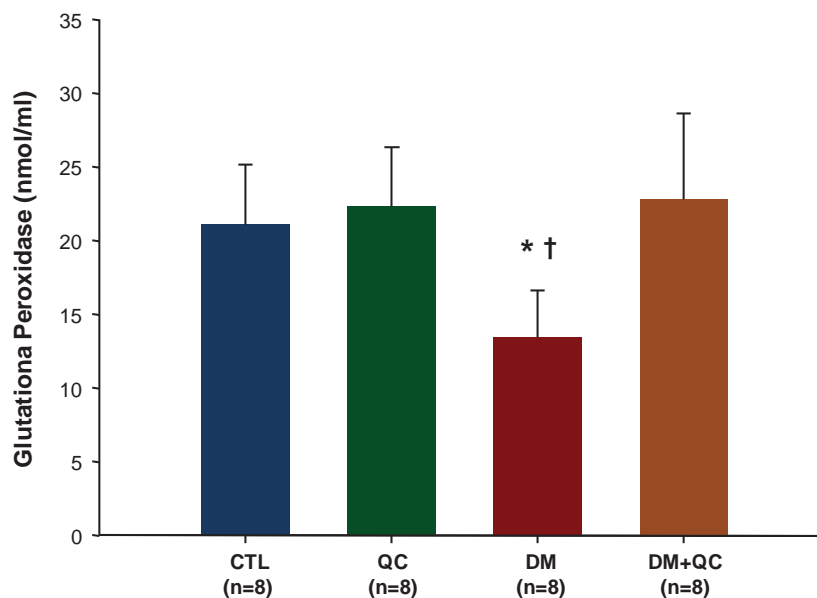


Gráfico 15: Concentração de glutatona peroxidase no soro. CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: $p < 0,05$ vs. CTL; †: $p < 0,05$ vs. DM+QC.

Os valores obtidos da avaliação do estresse oxidativo em amostras do tecido miocárdico do VE estão expostos na Tabela 9. A concentração de hidroperóxido de lipídio foi maior nos grupos diabéticos (DM e DM+QC) em relação aos seus respectivos controles (CTL e QC). A superóxido dismutase foi menor no grupo DM em relação ao grupo CTL, enquanto que no grupo diabético que recebeu a quercetina a redução não foi observada. Em relação a glutathiona peroxidase, não houve diferença entre os grupos.

Tabela 9. Avaliação do estresse oxidativo em amostras do tecido miocárdico do ventrículo esquerdo

Variável	CTL (n=8)	QC (n=8)	DM (n=8)	DM+QC (n=8)
Hidroperóxido de lipídio (nmol/mg proteína)	288 ± 18	290 ± 30 †	371 ± 40 *	346 ± 31
Superóxido dismutase (nmol/mg proteína)	11,2 ± 1,45	11,0 ± 1,54	9,47 ± 1,61 * †	11,0 ± 1,54
Glutathiona peroxidase (nmol/mg proteína)	38,2 ± 9,95	29,5 ± 10,8	28,7 ± 10,8	34,5 ± 20,9

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: p<0,05 vs. CTL; †: p<0,05 vs. DM+QC (ANOVA, esquema fatorial 2X2).

4.7 Avaliação da Expressão Gênica por RT-PCR

A expressão do gene da SERCA-2a foi menor nos grupos diabéticos (DM e DM+QC) e não foi observado efeito benéfico da quercetina (Tabela 10 e Gráfico 16). Em relação aos genes da PLB e RyR-2, não foi observada diferença entre os grupos (Tabela 10).

Tabela 10. Avaliação da expressão gênica por RT-PCR em tempo real (unidade arbitrária)

Variável	CTL (n=9)	QC (n=9)	DM (n=10)	DM+QC (n=9)
SERCA-2a	1,0 ± 0,39	1,12 ± 0,54 †	0,58 ± 0,18 *	0,45 ± 0,15
PLB	1,0 ± 0,64	0,99 ± 0,26	0,84 ± 0,36	0,80 ± 0,34
RyR-2	1,0 ± 0,41	1,23 ± 0,38	0,86 ± 0,23	0,93 ± 0,44

Valores expressos em média e desvio padrão. Valores normalizados pela expressão de ciclofilina. CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; SERCA-2a: Ca⁺²-ATPase do retículo sarcoplasmático; PLB: fosfolamban; RyR-2: receptor rianodínico tipo 2; †: p<0,05 vs. DM+QC (ANOVA, esquema fatorial 2X2).

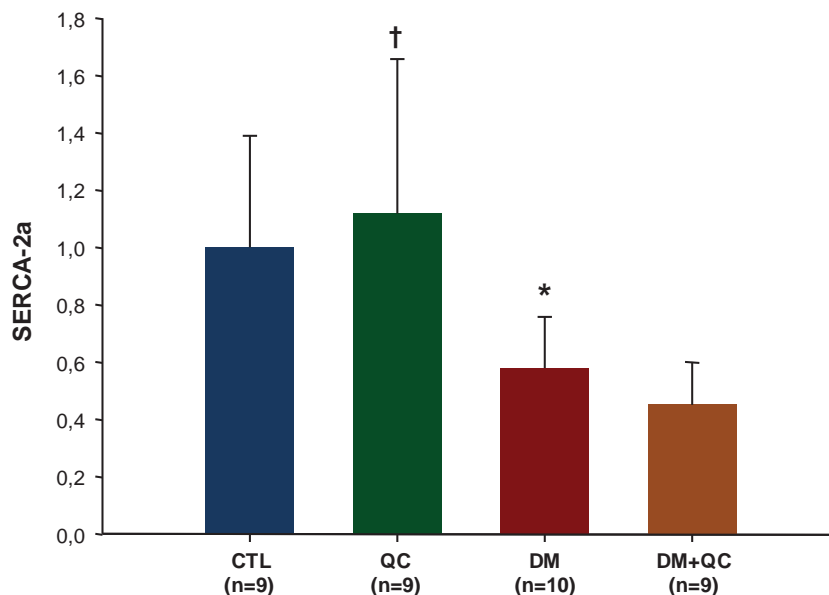


Gráfico 16: Ca⁺²-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA-2a). CTL: grupo controle; QC: grupo quercetina; DM: grupo diabético; DM+QC: grupo diabético + quercetina; *: p<0,05 vs. CTL; †: p<0,05 vs. DM+QC.

5. Discussão

Neste estudo avaliamos a influência do antioxidante quercetina na remodelação cardíaca e a atividade oxidativa de ratos Wistar diabéticos. A indução do estado diabético foi realizada por meio de administração do quimioterápico estreptozotocina, e o antioxidante utilizado foi a quercetina.

A estreptozotocina e aloxana são duas substâncias tóxicas para as células das ilhotas de Langerhans mais comumente usadas para indução do diabetes tipo 1 em modelos experimentais.

A estreptozotocina é uma glicosamina-nitrosuréia que causa morte de células beta pancreáticas, com consequente deficiência na biossíntese e secreção de insulina.⁹⁵⁻⁹⁷ A estreptozotocina penetra nas células beta via transportador de glicose GLUT2.⁹⁶ Entre os mecanismos propostos para a citotoxicidade desta substância está a alquilação do DNA e a formação de ERO.^{98,99} A ação intracelular da estreptozotocina causa uma cadeia de eventos que resulta na fragmentação do DNA nas células beta pancreáticas. Na tentativa de reparar o DNA, ocorre aumento da ativação da enzima poli (ADP-ribose) sintase, levando a depleção da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e dos estoques de ATP, culminando na destruição de células beta.^{97,100-104} Evidências indicam que a estreptozotocina gera ERO que contribuem para fragmentação do DNA. As ERO podem, portanto, ter papel essencial no efeito diabetogênico da estreptozotocina.^{95,105}

As características metabólicas da indução do DM por estreptozotocina incluem o desenvolvimento rápido de hiperglicemia profunda, modesta hipertrigliceridemia, cetose e redução acentuada nos níveis de insulina plasmática.^{106,107} O modelo experimental de diabetes tipo 1 é útil para examinar os

efeitos da hiperglicemia na ausência de hiperinsulinemia.¹⁰⁸

A quercetina é um flavonóide amplamente distribuído e consumido, presente em concentração elevada no chá, na maçã e na cebola.^{109,110} É o principal flavonol, uma sub-classe de flavonóides e pode ser um poderoso constituinte bioativo da dieta humana atuando sob duas formas, como agente removedor de radicais livres e interagindo com várias proteínas endógenas, por exemplo, agindo como um inibidor da atividade enzimática.¹¹⁰⁻¹¹² A quercetina e a rutina, outro flavonóide, são capazes de eliminar os radicais livres atuando em três processos: formação do íon superóxido, geração de radicais hidroxil na reação de Fenton e formação de radicais da peroxidação lipídica.¹¹³⁻¹¹⁵ Vários estudos já demonstraram efeito favorável da quercetina, como na remoção do superóxido na injúria de isquemia e reperfusão, na proteção contra o estresse oxidativo induzido por luz ultravioleta A, na hipertensão arterial sistêmica, na cirrose biliar secundária, na prevenção de angiogênese e carcinogênese e gastropatia hipertensiva portal.¹¹⁶⁻¹²⁵

No presente estudo, a mensuração inicial da glicemia e do peso corporal dos animais mostrou que os grupos CTL, QC, DM e DM+QC não apresentaram diferença estatisticamente significativa, evidenciando a homogeneidade entre os grupos. Para comprovar o estado diabético dos animais pertencentes aos grupos DM e DM+QC realizou-se dosagens de glicemia decorridos sete dias da aplicação de estreptozotocina, sendo que apenas os animais com glicemia acima de 220 mg/dL foram considerados diabéticos e incluídos no estudo.⁷⁵⁻⁷⁷ Outro dado compatível com o estado diabético dos animais foi o peso corporal final estatisticamente menor nos grupos diabéticos em relação aos não

diabéticos.^{126,127} Além disso, os animais diabéticos apresentaram maior consumo de ração e de água em relação aos não diabéticos (dados não apresentados). A quercetina não foi capaz de reduzir os valores de glicemia e de perda de peso corporal dos ratos diabéticos.

A pressão arterial foi aferida no final do experimento e não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Dessa forma, afastamos esse fator que poderia interferir na remodelação cardíaca induzida pelo DM. Na literatura, há relatos de que o DM não altera a pressão arterial,¹²⁸⁻¹³⁰ ou causa alterações, tanto redução¹³¹⁻¹³³ quanto elevação.¹³⁴⁻¹³⁶ Essas alterações estariam relacionadas à volemia ou às diferentes técnicas de medida da pressão arterial. Kusaka et al.¹³⁷ e Yamamoto¹²⁸ realizaram medidas da pressão arterial em ratos diabéticos por método direto (inserção de cânula arterial) e indireto (pletismografia), e observaram que no primeiro a pressão não se alterou ou foi menor, enquanto que no segundo, a pressão foi maior em relação aos animais não diabéticos.

A realização do ecocardiograma possibilitou a análise *in vivo* das variáveis estruturais do coração, assim como de parâmetros das funções sistólica e diastólica do VE. Os resultados mostraram que os grupos diabéticos apresentaram aumento das câmaras cardíacas esquerdas normalizadas pelo PC, e a quercetina foi capaz de atenuar o aumento do diâmetro do átrio esquerdo. A normalização desses diâmetros pelo PC pode trazer erros de interpretação uma vez que os diâmetros das cavidades cardíacas não guardam proporção exata com o PC.¹³⁸ No entanto, em nosso estudo, apesar da grande diferença do PC entre os grupos, os valores absolutos dos diâmetros do VE e do átrio esquerdo não se mostraram diferentes.

Portanto, podemos assumir que os animais diabéticos apresentaram dilatação do VE e do átrio esquerdo e a quercetina atenuou a dilatação do átrio esquerdo. Esses resultados são concordantes com vários relatos da literatura em que o diabetes mellitus acarretou dilatação das câmaras cardíacas.¹³⁹⁻¹⁴³ No presente estudo, como os valores da espessura relativa do VE não diferiram entre os grupos, a dilatação do VE foi acompanhada de aumento proporcional de suas paredes. Os valores de MVE/PC obtidos por ecocardiograma ou medidos *post mortem* mostraram-se maiores nos grupos diabéticos. Da mesma forma, os valores de massa do ventrículo direito e dos átrios normalizados pelo PC também foram maiores nos grupos diabéticos.

Os índices de função sistólica do VE mostraram-se comprometidos no grupo DM, uma vez que a $\% \Delta$ endo, a FE e a VEPP foram menores em relação ao grupo controle, e a quercetina foi capaz de atenuar a redução dos índices acima, exceto a VEPP. A função diastólica também apresentou-se alterada nos grupos diabéticos, tendo em vista o aumento do TRIV, assim como o TRIV normalizado pela frequência cardíaca, e não se alterou com a quercetina. Muitos autores, igualmente, relataram prejuízo nas funções sistólica e diastólica do VE, em estudos com ratos diabéticos.¹³⁹⁻¹⁴²

A análise da função do músculo papilar isolado mostrou que o grupo DM apresentou piora da função contrátil e de relaxamento na condição basal e após manobras para avaliação da reserva contrátil. Já foi observado em músculos papilares de ratos Wistar diabéticos, comprometimento da função miocárdica em condição basal (menor TD, $+dT/dt$, $-dT/dt$), porém sem diferença significativa no TPT.¹⁴⁴ Esses autores também relataram menor resposta dos músculos papilares à

estimulação β -adrenérgica. Outra pesquisa de diabetes em ratos Wistar mostrou diminuição significativa dos índices de contração ($+dP/dt_{max}$) e relaxamento ($-dP/dt_{max}$) em animais não sedados.¹⁴⁵ Por outro lado, Kim et al.¹⁴² não observaram diferença nesses índices obtidos de ratos Sprague-Dawley diabéticos anestesiados, embora tenham encontrado comprometimento do índice contrátil relação pressão-volume sistólica final.

No nosso estudo, verificamos que a quercetina foi capaz de prevenir ou atenuar as alterações funcionais ventriculares (*in vivo*) e miocárdicas (*in vitro*). O efeito benéfico do antioxidante sobre a função cardíaca também foi mostrado por Krishna et al.¹⁴⁶ Esses autores observaram, por ecocardiograma, reversão parcial da disfunção diastólica em ratos diabéticos que receberam rutina ou quercetina. No modelo experimental de agressão cardíaca induzida por doxorubicina, os flavonóides também mostraram efeito benéfico sobre o miocárdio.^{67,68} Além disso, estudos epidemiológicos com flavonóides constataram diminuição da mortalidade decorrente de complicações cardiovasculares.¹⁴⁷⁻¹⁵⁰

As avaliações do tecido colágeno foram realizadas por duas técnicas, a determinação da concentração miocárdica de hidroxiprolina e medida da fração de colágeno intersticial. Observamos elevação significativa da concentração de hidroxiprolina nos grupos diabéticos. Em relação à medida da fração colágena intersticial, houve aumento nos grupos diabéticos que não atingiu significância estatística. A quercetina não causou efeito benéfico nessas variáveis. Os estudos disponíveis na literatura são discordantes em relação ao aumento do tecido colágeno no miocárdio de animais diabéticos. Zhang et al.¹⁵¹ constataram por imunohistoquímica níveis aumentados de colágeno do tipo I. Por outro lado, Cosyns

et al.¹⁵² não observaram aumento de tecido fibroso no corte histológico do miocárdio de ratos diabéticos. Análise de tecido cardíaco *post mortem*, de pacientes diabéticos, demonstrou acúmulo de colágeno intersticial miocárdico e principalmente perivascular.¹⁵³

Os AGE, que estão elevados no soro e tecido de pacientes diabéticos, afetam a estrutura dos componentes da matriz extracelular, entre eles o colágeno.¹⁵⁴⁻¹⁵⁷ Os AGE ligam-se a receptores específicos tais como receptores de AGE (RAGE) em uma gama de tipos celulares incluindo macrófagos, células mesangiais, epiteliais e endoteliais, estimulando respostas celulares específicas que incluem aumento da liberação de citocinas (fator de necrose tumoral α e interleucina-1) e aumento da produção de fatores de crescimento (fator de transformação do crescimento beta – TGF- β , fator de crescimento de tecido conjuntivo - CTGF e fator de crescimento endotelial), resultando em angiogênese e aumento da matriz extracelular.¹⁵⁸⁻¹⁶² Além disso, os AGE exacerbam o estresse oxidativo intracelular que pode contribuir para lesão celular.¹⁶³ Em modelos animais de diabetes, uma série de manifestações patológicas das complicações diabéticas tem sido observada, incluindo inflamação, deposição de colágeno e aumento da expressão de fatores de crescimento, que podem ocasionar manifestação clínica de disfunção diastólica, aterosclerose e nefropatia.^{154,164}

No nosso experimento, a expressão gênica da SERCA-2a foi significativamente reduzida nos grupos diabéticos e a quercetina não interferiu na expressão. Em relação à PLB e RyR-2, não houve diferença da expressão gênica entre os grupos. Da mesma forma, em outro estudo, os ratos diabéticos apresentaram redução de 30% na expressão gênica de SERCA-2a.³⁶ Estudo com

cardiomiócitos expostos a elevada concentração extracelular de glicose resultou em prejuízo na contração e no trânsito intracelular de cálcio.¹⁶⁵ Alterações no trânsito intracelular de cálcio no diabetes mellitus tipo 1 tem sido bem documentada.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ O modelo de diabetes tipo 1 está associado com depressão da função contrátil enfatizada primariamente pela redução da recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático decorrente da menor atividade da bomba SERCA-2a. A diminuição da atividade da SERCA-2a é resultado da redução na expressão de SERCA-2a ou aumento de expressão da proteína inibitória da SERCA-2a, a PLB.^{169,170} No nosso estudo, houve redução da expressão da SERCA-2a sem alteração da expressão da PLB.

A relação entre o aumento do estresse oxidativo e os danos causados pelo diabetes é de reconhecida importância.¹⁷¹ Vários estudos têm relatado aumento do estresse oxidativo no coração de ratos diabéticos.^{143,144,172,173} Em nosso estudo, a análise da atividade oxidativa no soro mostrou que no grupo DM houve aumento do hidroperóxido de lipídio e diminuição das enzimas SOD e GSH-Px comparado ao grupo CTL, e a quercetina foi capaz de normalizar ou atenuar o estresse oxidativo. No tecido miocárdico, o hidroperóxido de lipídio apresentou-se elevado nos grupos diabéticos, e a SOD foi menor no grupo DM. A quercetina normalizou a SOD e não afetou a concentração de hidroperóxido de lipídio. Em relação a GSH-Px miocárdica, não houve diferença entre os grupos. O aumento da atividade pró-oxidante e a significativa diminuição de enzimas antioxidantes contribuem para o aumento do estresse oxidativo no diabetes. Embora os estudos mostrem redução na atividade de enzimas antioxidantes como a SOD, catalase e a GPx no diabetes, outros estudos mostram aumento de sua atividade em ratos diabéticos induzidos por

estreptozotocina.^{60,61,172-180} Estas divergências podem ser explicadas pela variabilidade do tecido, da severidade e duração da doença ou pelas condições experimentais.¹⁸¹⁻¹⁸³

A complexa e multifatorial natureza das alterações celulares e moleculares do diabetes mellitus que afetam a estrutura e função cardíaca ainda não está completamente elucidada.^{108,143,184}

Diversas hipóteses têm sido propostas na tentativa de explicar os mecanismos da diminuição da contratilidade miocárdica no diabetes mellitus. Entre os mecanismos mais prováveis estão: comprometimento na homeostase do cálcio, ativação do sistema renina-angiotensina, aumento do estresse oxidativo, alteração no metabolismo do substrato e disfunção mitocondrial.¹⁸⁵

Um dos principais moduladores da contratilidade cardíaca é o íon cálcio intracelular. No diabetes, anormalidades em sua homeostase levam a diversas alterações intracelulares como redução da atividade de ATPases e diminuição da função do retículo sarcoplasmático no transporte e estoque de cálcio e de trocadores como o do sódio-cálcio.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ Corações de animais com diabetes induzido por estreptozotocina apresentam diminuição da expressão e atividade de ATPases e da SERCA-2a e da expressão do trocador sódio-cálcio, com prejuízo da liberação e recaptura de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e da função mitocondrial.^{186,188-192}

A ativação do sistema renina-angiotensina constitui outro fator envolvido na patogênese da cardiomiopatia diabética. A densidade dos receptores da angiotensina II e sua expressão gênica estão elevadas no coração

diabético.^{193,194} A ativação do sistema renina-angiotensina tem sido associada a aumento do dano oxidativo, apoptose e necrose de células endoteliais e cardiomiócitos,¹⁹⁵ contribuindo para o desenvolvimento de fibrose intersticial no diabetes. Em estudos experimentais, o bloqueio do sistema renina-angiotensina resulta em efeitos benéficos como restauração da função do retículo sarcoplasmático, redução na produção das espécies reativas de oxigênio, diminuição de apoptose e fibrose, e atenuação da disfunção cardíaca.¹⁹⁶⁻²⁰⁰

Outro fator importante para o desenvolvimento e progressão da cardiomiopatia diabética é o aumento da produção de ERO.^{201,202} Em corações de animais diabéticos, foram observados aumento das espécies reativas de oxigênio, da produção de superóxido, e da expressão da NADPH oxidase, e redução da concentração de glutathiona oxidada e reduzida.^{197,203-208} O aumento do estresse oxidativo tem papel crítico em vários mecanismos relacionados à patogênese da cardiomiopatia diabética como lipotoxicidade, morte celular por apoptose ou necrose e alterações mitocondriais que levam a perda da eficiência energética do coração.^{185,209,210} Estratégias para redução das espécies reativas de oxigênio, como aumento da expressão de metalotioneína, catalase e superóxido dismutase, resultaram em reversão da disfunção cardíaca de animais com diabetes tipo 1 ou 2.^{201,202,211-213}

Alterações no metabolismo energético miocárdico também estão envolvidas na fisiopatogenia da cardiomiopatia diabética.^{214,215} O diabetes é caracterizado por diminuição da utilização de glicose e lactato e aumento no metabolismo de ácidos graxos. O aumento de ácidos graxos livres estimula receptores α ativados por proliferador do peroxissoma (PPAR α), resultando na

transcrição de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos.^{216,217} Os ácidos graxos oxidados induzem aumento da produção de ERO com consequente lipotoxicidade e disfunção miocárdica.^{218,219} Adicionalmente, lipídeos intermediários como a ceramida podem promover apoptose de cardiomiócitos.²²⁰ Estudos têm mostrado o papel da disfunção mitocondrial na patogênese da cardiomiopatia diabética.^{31,206,221-224} Avaliações da atividade mitocondrial no diabetes tipo 1 mostraram, além de redução da fosforilação oxidativa, diminuição da atividade da creatina fosfato e da síntese de ATP, com menor respiração mitocondrial estimulada por creatina.²²⁵⁻²²⁸ Essas alterações contribuem para a disfunção miocárdica por reduzirem a produção de ATP e, conseqüentemente, a reserva miocárdica de fosfatos de alta energia.

6. Conclusões

No modelo experimental de diabetes mellitus em ratos ocorre remodelação cardíaca associada a aumento do estresse oxidativo, que é atenuada ou normalizada pelo antioxidante quercetina. No entanto, a redução da expressão gênica da SERCA-2a miocárdica não se altera com a quercetina.

7. Referências Bibliográficas

1. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539-53.
 2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27:1047-53.
 3. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;87:4-14.
 4. Torquato MT, Montenegro Junior RM, Viana LA, Souza RA, Lanna CM, Lucas JC, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirao Preto (Sao Paulo), Brazil. *Sao Paulo Med J* 2003;121:224-30.
 5. Bosi PL, Carvalho AM, Contrera D, Casale G, Pereira MA, Gronner MF, et al. Prevalência de diabetes melito e tolerância à glicose diminuída na população urbana de 30 a 79 anos da cidade de São Carlos, São Paulo. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2009;53:726-32.
 6. DATASUS. Taxa de prevalência de diabete melito. In: Departamento de Informática do SUS, Ministério da Saúde; 2010.
 7. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19:257-67.
 8. Price KD, Price CS, Reynolds RD. Hyperglycemia-induced ascorbic acid deficiency promotes endothelial dysfunction and the development of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2001;158:1-12.
 9. Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol* 1974;34:29-34.
 10. Gu K, Cowie CC, Harris MI. Diabetes and decline in heart disease mortality in US adults. *JAMA* 1999;281:1291-7.
 11. Peter R, Okoseime OE, Rees A, Owens DR. Postprandial glucose - a potential therapeutic target to reduce cardiovascular mortality. *Curr Vasc Pharmacol* 2009;7:68-74.
-

12. Codinach Huix P, Freixa Pamias R. Diabetic cardiomyopathy: concept, heart function, and pathogenesis. *An Med Interna* 2002;19:313-20.
 13. Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol* 1972;30:595-602.
 14. Khavandi K, Khavandi A, Asghar O, Greenstein A, Withers S, Heagerty AM, et al. Diabetic cardiomyopathy--a distinct disease? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009;23:347-60.
 15. Airaksinen J, Ikaheimo M, Kaila J, Linnaluoto M, Takkunen J. Impaired left ventricular filling in young female diabetics. An echocardiographic study. *Acta Med Scand* 1984;216:509-16.
 16. Zarich SW, Arbuckle BE, Cohen LR, Roberts M, Nesto RW. Diastolic abnormalities in young asymptomatic diabetic patients assessed by pulsed Doppler echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 1988;12:114-20.
 17. Weytjens C, Cosyns B, Van Camp G, Daniels C, Spincemaille K, Dupont A, et al. Abnormal response to inotropic stimulation in young asymptomatic type I diabetic patients demonstrated by serial gated myocardial perfusion SPECT imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005;32:1317-23.
 18. Sanderson JE, Brown DJ, Rivellese A, Kohner E. Diabetic cardiomyopathy? An echocardiographic study of young diabetics. *Br Med J* 1978;1:404-7.
 19. Spector KS. Diabetic cardiomyopathy. *Clin Cardiol* 1998;21:885-7.
 20. Tomita M, Mukae S, Geshi E, Umetsu K, Nakatani M, Katagiri T. Mitochondrial respiratory impairment in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Jpn Circ J* 1996;60:673-82.
 21. Aksakal E, Akaras N, Kurt M, Tanboga IH, Halici Z, Odabasoglu F, et al. The role of oxidative stress in diabetic cardiomyopathy: an experimental study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011;15:1241-6.
 22. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010;107:1058-70.
-

23. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20.
 24. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991;40:405-12.
 25. Dabkowski ER, Williamson CL, Bukowski VC, Chapman RS, Leonard SS, Peer CJ, et al. Diabetic cardiomyopathy-associated dysfunction in spatially distinct mitochondrial subpopulations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:H359-69.
 26. Haskins K, Bradley B, Powers K, Fadok V, Flores S, Ling X, et al. Oxidative stress in type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1005:43-54.
 27. Baynes JW. Chemical modification of proteins by lipids in diabetes. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1159-65.
 28. Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J* 1987;245:243-50.
 29. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* 1991;10:339-52.
 30. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;212:167-78.
 31. An D, Rodrigues B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H1489-506.
 32. Bidasee KR, Nallani K, Yu Y, Cocklin RR, Zhang Y, Wang M, et al. Chronic diabetes increases advanced glycation end products on cardiac ryanodine receptors/calcium-release channels. *Diabetes* 2003;52:1825-36.
 33. Bidasee KR, Zhang Y, Shao CH, Wang M, Patel KP, Dincer UD, et al. Diabetes increases formation of advanced glycation end products on Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Diabetes* 2004;53:463-73.
 34. Clark RJ, McDonough PM, Swanson E, Trost SU, Suzuki M, Fukuda M, et al. Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation. *J Biol Chem* 2003;278:44230-7.
-

35. Ligeti L, Szenczi O, Prestia CM, Szabo C, Horvath K, Marcsek ZL, et al. Altered calcium handling is an early sign of streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *Int J Mol Med* 2006;17:1035-43.
 36. Depre C, Young ME, Ying J, Ahuja HS, Han Q, Garza N, et al. Streptozotocin-induced changes in cardiac gene expression in the absence of severe contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:985-96.
 37. Iribarren C, Karter AJ, Go AS, Ferrara A, Liu JY, Sidney S, et al. Glycemic control and heart failure among adult patients with diabetes. *Circulation* 2001;103:2668-73.
 38. Lipinski B. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2001;15:203-10.
 39. Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Alwahaibi N, Mohamed J. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2012;12:5-18.
 40. Thandavarayan RA, Giridharan VV, Watanabe K, Konishi T. Diabetic cardiomyopathy and oxidative stress: role of antioxidants. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2011;9:225-30.
 41. Tesoriere L, Ciaccio M, Valenza M, Bongiorno A, Maresi E, Albiero R, et al. Effect of vitamin A administration on resistance of rat heart against doxorubicin-induced cardiotoxicity and lethality. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;269:430-6.
 42. Li CJ, Zhang QM, Li MZ, Zhang JY, Yu P, Yu DM. Attenuation of myocardial apoptosis by alpha-lipoic acid through suppression of mitochondrial oxidative stress to reduce diabetic cardiomyopathy. *Chin Med J (Engl)* 2009;122:2580-6.
 43. Hamblin M, Smith HM, Hill MF. Dietary supplementation with vitamin E ameliorates cardiac failure in type I diabetic cardiomyopathy by suppressing myocardial generation of 8-iso-prostaglandin F2alpha and oxidized glutathione. *J Card Fail* 2007;13:884-92.
 44. Koçak G, Aktan F, Canbolat O, Ozogul C, Elbeg S, Yildizoglu-Ari N, et al. Alpha-lipoic acid treatment ameliorates metabolic parameters, blood pressure, vascular reactivity and morphology of vessels already damaged by streptozotocin-diabetes. *Diabetes Nutr Metab* 2000;13:308-18.
-

45. Pekiner B, Ulusu NN, Das-Evcimen N, Sahilli M, Aktan F, Stefek M, et al. In vivo treatment with stobadine prevents lipid peroxidation, protein glycation and calcium overload but does not ameliorate Ca²⁺-ATPase activity in heart and liver of streptozotocin-diabetic rats: comparison with vitamin E. *Biochim Biophys Acta* 2002;1588:71-8.
 46. Cunningham JJ, Mearkle PL, Brown RG. Vitamin C: an aldose reductase inhibitor that normalizes erythrocyte sorbitol in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* 1994;13:344-50.
 47. Keegan A, Walbank H, Cotter MA, Cameron NE. Chronic vitamin E treatment prevents defective endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Diabetologia* 1995;38:1475-8.
 48. Zobali F, Avci A, Canbolat O, Karasu C. Effects of vitamin A and insulin on the antioxidative state of diabetic rat heart: a comparison study with combination treatment. *Cell Biochem Funct* 2002;20:75-80.
 49. Golbidi S, Badran M, Laher I. Diabetes and alpha lipoic Acid. *Front Pharmacol* 2011;2:1-15.
 50. Fiordaliso F, Bianchi R, Staszewsky L, Cuccovillo I, Doni M, Laragione T, et al. Antioxidant treatment attenuates hyperglycemia-induced cardiomyocyte death in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:959-68.
 51. Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, Pogue J, Arnold JM, et al. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005;293:1338-47.
 52. Song Y, Cook NR, Albert CM, Van Denburgh M, Manson JE. Effects of vitamins C and E and beta-carotene on the risk of type 2 diabetes in women at high risk of cardiovascular disease: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2009;90:429-37.
 53. Marchioli R, Schweiger C, Levantesi G, Tavazzi L, Valagussa F. Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: epidemiological and clinical trial data. *Lipids* 2001;36 Suppl:S53-63.
 54. Lonn E, Yusuf S, Hoogwerf B, Pogue J, Yi Q, Zinman B, et al. Effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Diabetes Care* 2002;25:1919-27.
-

55. Bischoff SC. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11:733-40.
56. Wang M, Zhang WB, Zhu JH, Fu GS, Zhou BQ. Breviscapine ameliorates cardiac dysfunction and regulates the myocardial Ca(2+)-cycling proteins in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Diabetol* 2010;47:209-18.
57. Guimarães J, Di Muzio B, Cicogna A, Padovani A, Dal Pai Silva M, Okoshi M, et al. Avaliação funcional (in vivo e in vitro) e histológica do ventrículo esquerdo e bioquímica de ratos diabéticos tratados com o flavonóide rutina. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2006;16 supl B:36.
58. Annapurna A, Reddy CS, Akondi RB, Rao SR. Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. *J Pharm Pharmacol* 2009;61:1365-74.
59. Mahesh T, Menon VP. Quercetin alleviates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res* 2004;18:123-7.
60. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res* 2005;51:117-23.
61. Sanders RA, Rauscher FM, Watkins JB 3rd. Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2001;15:143-9.
62. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, et al. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 1999;100:1134-46.
63. Xu J, Zou MH. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation* 2009;120:1266-86.
64. Cai L, Kang YJ. Oxidative stress and diabetic cardiomyopathy: a brief review. *Cardiovasc Toxicol* 2001;1:181-93.
65. Fein FS, Kornstein LB, Strobeck JE, Capasso JM, Sonnenblick EH. Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circ Res* 1980;47:922-33.
-

66. Ramanadham S, Tenner TE Jr. Alterations in the myocardial beta-adrenoceptor system of streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 1987;136:377-89.
67. Chopra S, Pillai KK, Husain SZ, Giri DK. Propolis protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Exp Mol Pathol* 1995;62:190-8.
68. Sadzuka Y, Sugiyama T, Shimoi K, Kinoshita N, Hirota S. Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Lett* 1997;92:1-7.
69. Xiao J, Sun GB, Sun B, Wu Y, He L, Wang X, et al. Kaempferol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vivo and in vitro. *Toxicology* 2012;292:53-62.
70. Trivedi PP, Kushwaha S, Tripathi DN, Jena GB. Cardioprotective effects of hesperetin against doxorubicin-induced oxidative stress and DNA damage in rat. *Cardiovasc Toxicol* 2011;11:215-25.
71. Hebden RA, Gardiner SM, Bennett T, MacDonald IA. The influence of streptozotocin-induced diabetes mellitus on fluid and electrolyte handling in rats. *Clin Sci (Lond)* 1986;70:111-7.
72. Ozdemir S, Ugur M, Gurdal H, Turan B. Treatment with AT(1) receptor blocker restores diabetes-induced alterations in intracellular Ca(2+) transients and contractile function of rat myocardium. *Arch Biochem Biophys* 2005;435:166-74.
73. Fernandes AA, Novelli EL, Okoshi K, Okoshi MP, Di Muzio BP, Guimaraes JF, et al. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. *Biomed Pharmacother* 2010;64:214-9.
74. Bugger H, Abel ED. Rodent models of diabetic cardiomyopathy. *Dis Model Mech* 2009;2:454-66.
75. Babu PS, Srinivasan K. Renal lesions in streptozotocin-induced diabetic rats maintained on onion and capsaicin containing diets. *J Nutr Biochem* 1999;10:477-83.
76. Shih CC, Wu YW, Lin WC. Antihyperglycaemic and anti-oxidant properties of *Anoectochilus formosanus* in diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29:684-8.
-

77. Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes* 2002;51:1938-48.
78. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Frohlich ED. Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Lab Clin Med* 1971;78:957-62.
79. Simone G, Devereux RB, Camargo MJ, Volpe M, Wallerson DC, Atlas SA, et al. In vivo left ventricular anatomy in rats with two-kidney, one clip and one-kidney, one clip renovascular hypertension. *J Hypertens* 1992;10:725-32.
80. Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation* 1995;91:2642-54.
81. Paiva SA, Zornoff LA, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Matsubara BB, et al. Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H2242-6.
82. Godoy IE, Mor-Avi V, Weinert L, Vignon P, Korcarz C, Spencer KT, et al. Use of color kinesis for evaluation of left ventricular filling in patients with dilated cardiomyopathy and mitral regurgitation. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:1598-606.
83. Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Aragon FF, Okoshi MP. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *Am J Med Sci* 2000;320:244-8.
84. Cicogna A, Padovani C, Okoshi K, Matsubara L, Aragon F, Okoshi M. The influence of temporal food restriction on the performance of isolated cardiac muscle. *Nutr Res* 2001;21:639-48.
85. Sugizaki MM, Carvalho RF, Aragon FF, Padovani CR, Okoshi K, Okoshi MP, et al. Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to morphological damage in normotensive middle-aged rats. *J Biomed Sci* 2005;12:641-9.
86. Krebs H, Henseleit K. Untersuchungen über die Harnstoff-bildung im Türkörper. *Hoppe Deylers Z Physiol Chem* 1932;210:33-66.
-

87. Switzer B. Determination of hydroxyproline in tissue. *J Nutr Biochem* 1991;2:229-321.
88. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H1534-9.
89. Pereira B, Costa-Rosa LF, Bechara EJ, Newsholme P, Curi R. Changes in the TBARs content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of adrenalectomized rats. *Braz J Med Biol Res* 1998;31:827-33.
90. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 1991;26:853-6.
91. Nakamura W, Hosoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta* 1974;358:251-61.
92. Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G, Galbraith RA, Galbraith GM, Buse MG. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes* 1981;30:235-41.
93. Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* 2003;4:1120-8.
94. Zar J. *Bioestatistical Analysis*. Prentice-Hall Press. 4 ed. New Jersey, NJ, USA. ; 1999.
95. Bedoya FJ, Solano F, Lucas M. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia* 1996;52:344-7.
96. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 2000;43:1528-33.
97. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 1981;294:284-6.
-

98. Tjalve H, Wilander E, Johansson EB. Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J Endocrinol* 1976;69:455-6.
99. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* 1994;43:1326-33.
100. Morgan NG, Cable HC, Newcombe NR, Williams GT. Treatment of cultured pancreatic B-cells with streptozotocin induces cell death by apoptosis. *Biosci Rep* 1994;14:243-50.
101. Yamamoto H, Okamoto H. Protection by picolinamide, a novel inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase, against both streptozotocin-induced depression of proinsulin synthesis and reduction of NAD content in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;95:474-81.
102. Okamoto H. Regulation of proinsulin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin-dependent diabetes. *Mol Cell Biochem* 1981;37:43-61.
103. Bennett RA, Pegg AE. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res* 1981;41:2786-90.
104. Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res* 2002;512:121-34.
105. Takasu N, Komiya I, Asawa T, Nagasawa Y, Yamada T. Streptozocin- and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H₂O₂ as mediator for DNA fragmentation. *Diabetes* 1991;40:1141-5.
106. Fang ZY, Prins JB, Marwick TH. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2004;25:543-67.
107. Tahiliani AG, McNeill JH. Diabetes-induced abnormalities in the myocardium. *Life Sci* 1986;38:959-74.
108. Poornima IG, Parikh P, Shannon RP. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circ Res* 2006;98:596-605.
-

109. Justesen U, Knuthsen P, Leth T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 1998;799:101-10.
110. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727-47.
111. Kandaswami C, Middleton E Jr. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv Exp Med Biol* 1994;366:351-76.
112. Walle T, Eaton EA, Walle UK. Quercetin, a potent and specific inhibitor of the human P-form phenosulfotransferase. *Biochem Pharmacol* 1995;50:731-4.
113. Cai Q, Rahn RO, Zhang R. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Lett* 1997;119:99-107.
114. Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1989;38:1763-9.
115. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol* 2008;585:325-37.
116. Huk I, Brovkovych V, Nanobash Vili J, Weigel G, Neumayer C, Partyka L, et al. Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. *Br J Surg* 1998;85:1080-5.
117. Erden Inal M, Kahraman A. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats. *Toxicology* 2000;154:21-9.
118. Duarte J, Galisteo M, Ocete MA, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem* 2001;221:155-60.
119. Peres W, Tunon MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol* 2000;33:742-50.
-

120. Igura K, Ohta T, Kuroda Y, Kaji K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer Lett* 2001;171:11-6.
121. Yang K, Lamprecht SA, Liu Y, Shinozaki H, Fan K, Leung D, et al. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis* 2000;21:1655-60.
122. Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zettler C, Marroni C, et al. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1939-46.
123. Galluzzo P, Martini C, Bulzomi P, Leone S, Bolli A, Pallottini V, et al. Quercetin-induced apoptotic cascade in cancer cells: antioxidant versus estrogen receptor alpha-dependent mechanisms. *Mol Nutr Food Res* 2009;53:699-708.
124. Duarte J, Perez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, et al. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 2001;133:117-24.
125. Vasquez-Garzon VR, Arellanes-Robledo J, Garcia-Roman R, Aparicio-Rautista DI, Villa-Trevino S. Inhibition of reactive oxygen species and pre-neoplastic lesions by quercetin through an antioxidant defense mechanism. *Free Radic Res* 2009;43:128-37.
126. Hakam AC, Siddiqui AH, Hussain T. Renal angiotensin II AT2 receptors promote natriuresis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F503-8.
127. Jung HW, Jung JK, Ramalingam M, Yoon CH, Bae HS, Park YK. Anti-diabetic effect of Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J Pharmacol* 2012;44:97-102.
128. Yamamoto J. Blood pressure and metabolic effects of streptozotocin in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens A* 1988;10:1065-83.
129. Akiyama N, Okumura K, Watanabe Y, Hashimoto H, Ito T, Ogawa K, et al. Altered acetylcholine and norepinephrine concentrations in diabetic rat hearts. Role of parasympathetic nervous system in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 1989;38:231-6.
-

130. Wiene W, Richard S, Champeroux P, Audeval-Gerard C. Comparative antihypertensive and renoprotective effects of telmisartan and lisinopril after long-term treatment in hypertensive diabetic rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2001;2:31-6.
131. Tomlinson KC, Gardiner SM, Bennett T. Central effects of angiotensins I and II in conscious streptozotocin-treated rats. *Am J Physiol* 1990;258:R1147-56.
132. De Angelis K, Schaan BD, Maeda CY, Dall'Ago P, Wichi RB, Irigoyen MC. Cardiovascular control in experimental diabetes. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1091-100.
133. Yamamoto J, Nakai M. Coronary hemodynamics in diabetic spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens A* 1990;12:325-42.
134. Ramos OL. Diabetes mellitus and hypertension. State of the art lecture. *Hypertension* 1988;11:114-8.
135. Fein FS, Miller B, Flores M, Morton E. Myocardial adaptation to chronic propranolol therapy in diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17:846-53.
136. Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, Takeda R. Production of endothelin-1 from the mesenteric arteries of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 1991;48:2553-6.
137. Kusaka M, Kishi K, Sokabe H. Does so-called streptozocin hypertension exist in rats? *Hypertension* 1987;10:517-21.
138. Moreira VO, Castro AV, Yaegaschi MY, Cicogna AC, Okoshi MP, Pereira CA, et al. Echocardiographic criteria for the definition of ventricular dysfunction severity in aortic banded rats. *Arq Bras Cardiol* 2006;86:432-8.
139. Joffe II, Travers KE, Perreault-Micale CL, Hampton T, Katz SE, Morgan JP, 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;34:2111-9.
140. Mihm MJ, Seifert JL, Coyle CM, Bauer JA. Diabetes related cardiomyopathy time dependent echocardiographic evaluation in an experimental rat model. *Life Sci* 2001;69:527-42.
-

141. Akula A, Kota MK, Gopisetty SG, Chitrapu RV, Kalagara M, Kalagara S, et al. Biochemical, histological and echocardiographic changes during experimental cardiomyopathy in STZ-induced diabetic rats. *Pharmacol Res* 2003;48:429-35.
142. Kim DH, Kim YJ, Kim HK, Chang SA, Kim MS, Sohn DW, et al. Usefulness of mitral annulus velocity for the early detection of left ventricular dysfunction in a rat model of diabetic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Ultrasound* 2010;18:6-11.
143. Wang J, Wang H, Hao P, Xue L, Wei S, Zhang Y, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase 2 by oxidative stress is associated with cardiac dysfunction in diabetic rats. *Mol Med* 2011;17:172-9.
144. Aragno M, Mastrocola R, Alloatti G, Vercellinatto I, Bardini P, Geuna S, et al. Oxidative stress triggers cardiac fibrosis in the heart of diabetic rats. *Endocrinology* 2008;149:380-8.
145. Borges GR, Oliveira M, Salgado HC, Fazan R Jr. Myocardial performance in conscious streptozotocin diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 2006;5:26.
146. Krishna KM, Annapurna A, Gopal GS, Chalam CR, Madan K, Kumar VK, et al. Partial reversal by rutin and quercetin of impaired cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2005;83:343-55.
147. Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 1995;155:381-6.
148. McCullough ML, Peterson JJ, Patel R, Jacques PF, Shah R, Dwyer JT. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. *Am J Clin Nutr* 2012;95:454-64.
149. Mink PJ, Scrafford CG, Barraj LM, Harnack L, Hong CP, Nettleton JA, et al. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2007;85:895-909.
150. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993;342:1007-11.
-

151. Zhang L, Cannell MB, Phillips AR, Cooper GJ, Ward ML. Altered calcium homeostasis does not explain the contractile deficit of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 2008;57:2158-66.
152. Cosyns B, Droogmans S, Hernot S, Degallier C, Garbar C, Weytjens C, et al. Effect of streptozotocin-induced diabetes on myocardial blood flow reserve assessed by myocardial contrast echocardiography in rats. *Cardiovasc Diabetol* 2008;7:26.
153. Factor SM, Okun EM, Minase T. Capillary microaneurysms in the human diabetic heart. *N Engl J Med* 1980;302:384-8.
154. Beisswenger PJ, Makita Z, Curphey TJ, Moore LL, Jean S, Brinck-Johnsen T, et al. Formation of immunochemical advanced glycosylation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. *Diabetes* 1995;44:824-9.
155. Sell DR, Lapolla A, Odetti P, Fogarty J, Monnier VM. Pentosidine formation in skin correlates with severity of complications in individuals with long-standing IDDM. *Diabetes* 1992;41:1286-92.
156. Berg TJ, Snorgaard O, Faber J, Torjesen PA, Hildebrandt P, Mehlsen J, et al. Serum levels of advanced glycation end products are associated with left ventricular diastolic function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22:1186-90.
157. Kalousova M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res* 2002;51:597-604.
158. Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, et al. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest* 1996;97:238-43.
159. Skolnik EY, Yang Z, Makita Z, Radoff S, Kirshtein M, Vlassara H. Human and rat mesangial cell receptors for glucose-modified proteins: potential role in kidney tissue remodelling and diabetic nephropathy. *J Exp Med* 1991;174:931-9.
160. Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrad R, Stern D. Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest* 1993;91:2155-68.
-

161. Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA, Pasagian A. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science* 1988;240:1546-8.
162. Throckmorton DC, Brogden AP, Min B, Rasmussen H, Kashgarian M. PDGF and TGF-beta mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products. *Kidney Int* 1995;48:111-7.
163. Ziemann SJ, Kass DA. Advanced glycation endproduct crosslinking in the cardiovascular system: potential therapeutic target for cardiovascular disease. *Drugs* 2004;64:459-70.
164. Cooper ME. Importance of advanced glycation end products in diabetes-associated cardiovascular and renal disease. *Am J Hypertens* 2004;17:31S-8S.
165. Ren J, Gintant GA, Miller RE, Davidoff AJ. High extracellular glucose impairs cardiac E-C coupling in a glycosylation-dependent manner. *Am J Physiol* 1997;273:H2876-83.
166. Penpargkul S, Fein F, Sonnenblick EH, Scheuer J. Depressed cardiac sarcoplasmic reticular function from diabetic rats. *J Mol Cell Cardiol* 1981;13:303-9.
167. Ganguly PK, Pierce GN, Dhalla KS, Dhalla NS. Defective sarcoplasmic reticular calcium transport in diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol* 1983;244:E528-35.
168. Pierce GN, Kutryk MJ, Dhalla NS. Alterations in Ca²⁺ binding by and composition of the cardiac sarcolemmal membrane in chronic diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:5412-6.
169. Kim HW, Ch YS, Lee HR, Park SY, Kim YH. Diabetic alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and phospholamban protein expression. *Life Sci* 2001;70:367-79.
170. Trost SU, Belke DD, Bluhm WF, Meyer M, Swanson E, Dillmann WH. Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 2002;51:1166-71.
171. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17:24-38.
-

172. Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Thomas TP, Hill M, Khaper N, Singal PK. Probuocol improves antioxidant activity and modulates development of diabetic cardiomyopathy. *Nutrition* 1995;11:551-4.
173. Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Khaper N, Seneviratne C, Singal PK. Probuocol treatment reverses antioxidant and functional deficit in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 1996;160-161:283-8.
174. Ozkaya YG, Agar A, Yargicoglu P, Hacioglu G, Bilmen-Sarikcioglu S, Ozen I, et al. The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats. *Diabetes Metab* 2002;28:377-84.
175. Sekeroglu MR, Sahin H, Dulger H, Algun E. The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2000;33:669-74.
176. Yilmaz HR, Uz E, Yucel N, Altuntas I, Ozcelik N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *J Biochem Mol Toxicol* 2004;18:234-8.
177. Aliciguzel Y, Ozen I, Aslan M, Karayalcin U. Activities of xanthine oxidoreductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats. *J Lab Clin Med* 2003;142:172-7.
178. Huang WC, Juang SW, Liu IM, Chi TC, Cheng JT. Changes of superoxide dismutase gene expression and activity in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett* 1999;275:25-8.
179. Babu PV, Sabitha KE, Shyamaladevi CS. Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. *Chem Biol Interact* 2006;162:114-20.
180. Stefek M, Sotnikova R, Okruhlicova L, Volkovova K, Kucharska J, Gajdosik A, et al. Effect of dietary supplementation with the pyridoindole antioxidant stobadine on antioxidant state and ultrastructure of diabetic rat myocardium. *Acta Diabetol* 2000;37:111-7.
181. Ugochukwu NH, Bagayoko ND, Antwi ME. The effects of dietary caloric restriction on antioxidant status and lipid peroxidation in mild and severe streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 2004;348:121-9.
-

182. Niedowicz DM, Daleke DL. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys* 2005;43:289-330.
183. Wohaieb SA, Godin DV. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes* 1987;36:1014-8.
184. Okoshi K, Guimaraes JF, Di Muzio BP, Fernandes AA, Okoshi MP. Diabetic cardiomyopathy. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007;51:160-7.
185. Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation* 2007;115:3213-23.
186. Zhao XY, Hu SJ, Li J, Mou Y, Chen BP, Xia Q. Decreased cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity contributes to cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Physiol Biochem* 2006;62:1-8.
187. Pierce GN, Dhalla NS. Cardiac myofibrillar ATPase activity in diabetic rats. *J Mol Cell Cardiol* 1981;13:1063-9.
188. Lopaschuk GD, Tahiliani AG, Vadlamudi RV, Katz S, McNeill JH. Cardiac sarcoplasmic reticulum function in insulin- or carnitine-treated diabetic rats. *Am J Physiol* 1983;245:H969-76.
189. Flarsheim CE, Grupp IL, Matlib MA. Mitochondrial dysfunction accompanies diastolic dysfunction in diabetic rat heart. *Am J Physiol* 1996;271:H192-202.
190. Hattori Y, Matsuda N, Kimura J, Ishitani T, Tamada A, Gando S, et al. Diminished function and expression of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger in diabetic rats: implication in Ca²⁺ overload. *J Physiol* 2000;527 Pt 1:85-94.
191. Choi KM, Zhong Y, Hoit BD, Grupp IL, Hahn H, Dilly KW, et al. Defective intracellular Ca(2+) signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1398-408.
192. Suarez J, Scott B, Dillmann WH. Conditional increase in SERCA2a protein is able to reverse contractile dysfunction and abnormal calcium flux in established diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:R1439-45.
-

193. Khatter JC, Sadri P, Zhang M, Hoeschen RJ. Myocardial angiotensin II (Ang II) receptors in diabetic rats. *Ann N Y Acad Sci* 1996;793:466-72.
194. Fiordaliso F, Li B, Latini R, Sonnenblick EH, Anversa P, Leri A, et al. Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats is angiotensin II- dependent. *Lab Invest* 2000;80:513-27.
195. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, et al. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res* 2000;87:1123-32.
196. Brown L, Wall D, Marchant C, Sernia C. Tissue-specific changes in angiotensin II receptors in streptozotocin-diabetic rats. *J Endocrinol* 1997;154:355-62.
197. Singh VP, Le B, Rhode R, Baker KM, Kumar R. Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. *Diabetes* 2008;57:3297-306.
198. Fiordaliso F, Cuccovillo I, Bianchi R, Bai A, Doni M, Salio M, et al. Cardiovascular oxidative stress is reduced by an ACE inhibitor in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Life Sci* 2006;79:121-9.
199. Liu X, Suzuki H, Sethi R, Tappia PS, Takeda N, Dhalla NS. Blockade of the renin-angiotensin system attenuates sarcolemma and sarcoplasmic reticulum remodeling in chronic diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1084:141-54.
200. Yaras N, Bilginoglu A, Vassort G, Turan B. Restoration of diabetes-induced abnormal local Ca²⁺ release in cardiomyocytes by angiotensin II receptor blockade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H912-20.
201. Cai L. Suppression of nitrate damage by metallothionein in diabetic heart contributes to the prevention of cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med* 2006;41:851-61.
202. Cai L, Wang Y, Zhou G, Chen T, Song Y, Li X, et al. Attenuation by metallothionein of early cardiac cell death via suppression of mitochondrial oxidative stress results in a prevention of diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1688-97.
-

203. Ghosh S, Ting S, Lau H, Pulinilkunnil T, An D, Qi D, et al. Increased efflux of glutathione conjugate in acutely diabetic cardiomyocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 2004;82:879-87.
204. Ghosh S, Pulinilkunnil T, Yuen G, Kewalramani G, An D, Qi D, et al. Cardiomyocyte apoptosis induced by short-term diabetes requires mitochondrial GSH depletion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H768-76.
205. Ceylan-Isik AF, Wu S, Li Q, Li SY, Ren J. High-dose benfotiamine rescues cardiomyocyte contractile dysfunction in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Appl Physiol* 2006;100:150-6.
206. Lashin OM, Szweda PA, Szweda LI, Romani AM. Decreased complex II respiration and HNE-modified SDH subunit in diabetic heart. *Free Radic Biol Med* 2006;40:886-96.
207. Wold LE, Ceylan-Isik AF, Fang CX, Yang X, Li SY, Sreejayan N, et al. Metallothionein alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: role of Ca²⁺ cycling proteins, NADPH oxidase, poly(ADP-Ribose) polymerase and myosin heavy chain isozyme. *Free Radic Biol Med* 2006;40:1419-29.
208. Lei S, Liu Y, Liu H, Yu H, Wang H, Xia Z. Effects of N-acetylcysteine on nicotinamide dinucleotide phosphate oxidase activation and antioxidant status in heart, lung, liver and kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. *Yonsei Med J* 2012;53:294-303.
209. Barouch LA, Berkowitz DE, Harrison RW, O'Donnell CP, Hare JM. Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice. *Circulation* 2003;108:754-9.
210. Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:615-21.
211. Ye G, Metreveli NS, Donthi RV, Xia S, Xu M, Carlson EC, et al. Catalase protects cardiomyocyte function in models of type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes* 2004;53:1336-43.
212. Matsushima S, Kinugawa S, Ide T, Matsusaka H, Inoue N, Ohta Y, et al. Overexpression of glutathione peroxidase attenuates myocardial remodeling and preserves diastolic function in diabetic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H2237-45.
-

213. Shen X, Zheng S, Metreveli NS, Epstein PN. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 2006;55:798-805.
214. Lopaschuk GD. Metabolic abnormalities in the diabetic heart. *Heart Fail Rev* 2002;7:149-59.
215. Taegtmeyer H, McNulty P, Young ME. Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part I: general concepts. *Circulation* 2002;105:1727-33.
216. Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, et al. The cardiac phenotype induced by PPARAlpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2002;109:121-30.
217. Finck BN, Han X, Courtois M, Aimond F, Nerbonne JM, Kovacs A, et al. A critical role for PPARAlpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1226-31.
218. Sharma S, Adroque JV, Golfman L, Uray I, Lemm J, Youker K, et al. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *Faseb J* 2004;18:1692-700.
219. McGavock JM, Victor RG, Unger RH, Szczepaniak LS. Adiposity of the heart, revisited. *Ann Intern Med* 2006;144:517-24.
220. Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, et al. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1784-9.
221. Russell LK, Mansfield CM, Lehman JJ, Kovacs A, Courtois M, Saffitz JE, et al. Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ Res* 2004;94:525-33.
222. Boudina S, Abel ED. Mitochondrial uncoupling: a key contributor to reduced cardiac efficiency in diabetes. *Physiology (Bethesda)* 2006;21:250-8.
-

223. Bugger H, Chen D, Riehle C, Soto J, Theobald HA, Hu XX, et al. Tissue-specific remodeling of the mitochondrial proteome in type 1 diabetic akita mice. *Diabetes* 2009;58:1986-97.
224. Baseler WA, Dabkowski ER, Williamson CL, Croston TL, Thapa D, Powell MJ, et al. Proteomic alterations of distinct mitochondrial subpopulations in the type 1 diabetic heart: contribution of protein import dysfunction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;300:R186-200.
225. Pierce GN, Dhalla NS. Heart mitochondrial function in chronic experimental diabetes in rats. *Can J Cardiol* 1985;1:48-54.
226. Savabi F. Mitochondrial creatine phosphokinase deficiency in diabetic rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;154:469-75.
227. Awaji Y, Hashimoto H, Matsui Y, Kawaguchi K, Okumura K, Ito T, et al. Isoenzyme profiles of creatine kinase, lactate dehydrogenase, and aspartate aminotransferase in the diabetic heart: comparison with hereditary and catecholamine cardiomyopathies. *Cardiovasc Res* 1990;24:547-54.
228. Veksler VI, Murat I, Ventura-Clapier R. Creatine kinase and mechanical and mitochondrial functions in hereditary and diabetic cardiomyopathies. *Can J Physiol Pharmacol* 1991;69:852-8.
-