

Klinsmann Carolo dos Santos

Influência do resveratrol sobre metabolismo energético, estresse oxidativo e expressão da SIRT1 no miocárdio de ratos diabéticos

Orientadora: Profa. Dra. *Ana Angélica Henrique Fernandes*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação “Ciências Biológicas (Farmacologia)” do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia) – Ciências Biológicas.

Botucatu
2014

Dedicatoria

À minha família, principalmente aos meus pais, Clélia e Valdecir, aos meus avós, Carmen, Orlando e Onadir e a minha tia, Patrícia, por todo apoio, dedicação e confiança. Por acreditarem nos meus sonhos e segui-los comigo, lado a lado. Sem vocês nada disso seria possível.

Muito obrigado!

A minha orientadora, Ana Angélica, por acreditar no meu potencial, por toda confiança e dedicação. Por me guiar em todas as fases dessa etapa e por contribuir com meu crescimento profissional.

Serei sempre grato.

Obrigado!

Agradecimientos

Agradeço a toda minha família, amigos e colaboradores.

A amiga Camila P. Braga, por toda ajuda e apoio, dentro e fora da universidade. Serei sempre grato.

Ao meu companheiro de laboratório, Pedro O. Barbanera, por toda ajuda.

Ao Departamento de Química e Bioquímica/IB, em especial Sr. Fábio Henrique Fava, Sras. Lourdes Ribeiro de Lemos e Gabriela Cristina G. V. Athanázio pelo apoio técnico e administrativo.

Ao Prof. Fábio R. F. Seiva por compartilhar as experiências vivenciadas na Pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano, por me receber de braços abertos em seu laboratório e pela participação significativa na análise de western blotting.

À seção de Pós-graduação e coordenação do programa pelo suporte acadêmico.

À CAPES pelo apoio financeiro ao conceder a bolsa de estudos e à FAPESP pelo auxílio de pesquisa.

Resumo

Estudos sugerem que o *Diabetes mellitus* (DM) promove alterações no metabolismo energético e estresse oxidativo, que constituem fatores importantes para desencadear distúrbios cardiovasculares. A utilização de antioxidantes tem despertado interesse na clínica devido a propriedades terapêuticas sobre as doenças cardiovasculares, podendo, desta forma, evitar a morbimortalidade em pacientes diabéticos. Neste sentido, propõe-se estudar o efeito do resveratrol (RSV - 3,5,4'-trihydroxystilbene) através de parâmetros bioquímicos séricos, metabolismo energético e estresse oxidativo no tecido cardíaco de ratos com diabetes mellitus tipo 1. Foram utilizados 32 ratos, raça *wistar*, com peso corporal \pm 250g. Os animais foram distribuídos nos grupos experimentais ($n=8$): G₁ (normais, controle); G₂ (normais, tratados com resveratrol); G₃ (diabéticos não tratados); G₄ (diabéticos, tratados com resveratrol). O Diabetes mellitus experimental foi induzido através da administração intraperitoneal de estreptozotocina (STZ), em dose única, na concentração de 60 mg/kg de peso corporal. Os animais pertencentes aos grupos G₂ e G₄ receberam resveratrol, via gavagem, na concentração de 1,0 mg/kg/dia durante 30 dias. No final do período experimental (30 dias) foram avaliados parâmetros nutricionais e determinou-se a glicemia, triacilgliceróis (TG), colesterol total (CT), frações lipoproteicas e atividade da lactato desidrogenase (LDH). No tecido cardíaco foi determinada a concentração de proteínas totais, glicogênio, hidroperóxido de lipídio (HP), glutathiona total, glutathiona reduzida, glutathiona peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD), atividade das enzimas marcadoras do metabolismo energético, lactato desidrogenase (LDH), citrato sintase (CS) e β -hidroxiacil hidroxilase (OHADH), além da expressão da proteína situína (SIRT1) através da técnica *Western Blotting*. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 8 repetições, segundo análise de variância (ANOVA). O nível

de significância adotado foi de 5% de probabilidade e as estatísticas F foram significativas quando $p < 0.05$. Foi utilizado Teste de Tukey para a comparação entre as médias, e Mann-Whitney para análise dos resultados obtidos para expressão da SIRT1. Houve redução ($p < 0.05$) tanto no consumo alimentar como na energia ingerida, além de maior peso corporal em animais diabéticos tratados com RSV (G4), quando comparados a animais diabéticos não tratados (G3). A administração de RSV em G4 também promoveu diminuição da glicemia e dos níveis de CT, assim como aumento da concentração sérica de HDL-colesterol. Os níveis séricos de ureia e creatinina apresentaram-se aumentados em animais não tratados (G3), o oposto foi observado em G4. RSV promoveu diminuição da atividade das enzimas CS e OHADH, envolvidas no metabolismo de carboidratos e lipídios. Houve aumento na concentração cardíaca de glicogênio em G4. Quanto aos parâmetros do estresse oxidativo, a administração de RSV em G4 promoveu diminuição da concentração de HP e aumento da atividade das enzimas antioxidantes GSH-Px e SOD, quando comparado a animais não tratados (G3). RSV apresentou tendência em aumentar a expressão cardíaca de SIRT1 em animais que recebeu RSV (G2 e G4). Através dos resultados obtidos, conclui-se que RSV apresenta atividade anti-diabetogênica, com melhora no metabolismo de carboidratos e, portanto, aumento da utilização de glicose como substrato oxidável. Além disso, RSV apresentou atividade antioxidante, com capacidade de diminuir HP e elevar a atividade das enzimas antioxidantes no miocárdio de animais diabéticos.

Abstract

Studies suggest *Diabetes mellitus* (DM) promotes alterations on energy metabolism and oxidative stress, which provide important factors to initiate cardiovascular disorders. The use of antioxidants has aroused interest on clinical due therapeutics properties on cardiovascular diseases, and may thus prevent morbidity-mortality in diabetic patients. In this sense, it is proposed to study the effect of resveratrol (RSV - 3,5,4'-trihydroxystilbene) via serum biochemical parameters, energy metabolism and oxidative stress in heart tissue of rats with diabetes mellitus type 1. 32 rats, Wistar race, with \pm 250g body weight were used. The animals were divided into experimental groups (n = 8) : G1 (normal control), G2 (normal, treated with resveratrol), G3 (diabetic untreated) , G4 (diabetic treated with resveratrol) . The experimental Diabetes mellitus was induced by the intraperitoneal administration of streptozotocin (STZ) in a single dose, at a concentration of 60 mg / kg body weight. The animals in Groups G2 and G4 received RSV via gavage at 1.0 mg/kg/day for 30 days. At the end of the experimental period (30 days), nutritional parameters were evaluated and determined to glucose, triglycerides (TG), total cholesterol (TC), lipoprotein fractions and lactate dehydrogenase (LDH) activity. In cardiac tissue, concentration of total protein, glycogen, lipid hydroperoxide (HP), total glutathione, reduced glutathione, glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) was determined and activity of marker enzymes of energy metabolism, lactate dehydrogenase (LDH), citrate synthase (CS) and β -hydroxyacyl hydroxylase (OHADH), and the expression of Sirtuin protein (SIRT1) through Western Blotting. The experimental design was completely randomized with 4 treatments and 8 replicates, according to analysis of variance (ANOVA). The level of significance was set at 5% probability and F statistics were significant at $P < 0.05$. Tukey test was used to compare the means, and Mann-Whitney test to analyze the results obtained for

SIRT1. Decreased ($p < 0.05$), both in food consumption, energy intake and greater body weight in diabetic animals treated with RSV (G4) compared to untreated diabetic animals (G3). Administration of RSV in G4 also caused a decrease in serum glucose and TC levels, as well as an increase in serum HDL-cholesterol. Serum urea and creatinine were increased in untreated animals (G3), the opposite was observed in G4. RSV caused a decrease in the activity of CS and OHADH enzymes involved in the metabolism of carbohydrates and lipids. There was an increase in cardiac glycogen concentration in G4. The parameters of oxidative stress, administration of RSV in G4 caused a decrease in the concentration of HP and increased activity of antioxidant enzymes GSH-Px and SOD compared to untreated animals (G3). RSV tended to increase the concentration of cardiac SIRT1 in animals that received RSV (G2 and G4). Through these results, we conclude that RSV has anti-diabetogenic activity, with improvement in carbohydrate metabolism and therefore increased use of glucose as oxidizable substrate. In addition, RSV showed antioxidant activity, capable of lowering HP and increase antioxidant enzyme activity in the myocardium of diabetic animals.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
2. HIPÓTESE	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
5. RESULTADOS	29
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO.....	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

Introdução

Diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica importante caracterizada pela secreção e/ou ação da insulina endógena deficiente, acompanhada por uma hiperglicemia crônica e persistente. Vários fatores estão envolvidos nesta patologia, sendo que os nutricionais e a autoimunidade são os principais preditores da patogênese (SHEWADE et al, 2001; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

Em 2000, a World Health Organization (WHO) notificou um total de 171 milhões indivíduos da população mundial portadores de DM (WILD et al., 2004) em estudos mais recentes, realizado por Whiting et al., (2011) estimaram que em 2011 havia cerca de 366 milhões de pessoas portadoras de diabetes, e prevêem que esse número deverá aumentar em torno de 552 milhões até 2030. É considerado problema de saúde pública, uma vez que está associada a complicações que comprometem a produtividade, qualidade de vida e sobrevida dos indivíduos afetados, além de envolver altos custos no seu tratamento (WILLIAMS; AIREY, 2002).

DM pode ser classificado basicamente em dois tipos clínicos principais. Diabetes mellitus tipo 1 insulino dependente (DM1), acomete cerca de 10% da população diabética, é causada pela destruição autoimune das células β -pancreáticas, resultando em secreção deficiente de insulina. O tipo 2 insulino independente, com maior prevalência, ocorre de forma heterogênea devido a multiplicidade de fatores, como síndrome metabólica, obesidade e resistência à insulina. Em função da resistência à ação insulínica ocorre hiperinsulinemia, o que pode ocasionar, mais tardiamente, falhas na secreção de insulina (MARX, 2002). Assim, ocorre prejuízo na internalização da glicose em células, principalmente musculares e adiposas, levando, portanto a hiperglicemia que provoca dano tecidual

e o desenvolvimento das complicações diabéticas (BROWNLEE, 2001; RESNICK; HOWARD, 2002).

Estudos experimentais e clínicos revelaram que a hiperglicemia estabelecida no DM está associada à produção aumentada de radicais livres derivados do oxigênio molecular, denominadas de espécies reativas de oxigênio (ERO) (ROSEN et al., 2001; BONNEFONT-ROUSSELOT, 2004; JOHANSEN et al., 2005). Os radicais livres são átomos, íons ou moléculas que contêm um elétron não pareado em sua órbita externa, por serem instáveis apresentam elevada capacidade reativa e, portanto se comportam como agentes oxidantes (HALLIWELL et al., 1992; FRIDOVICH, 1998).

Elevados níveis de radicais livres provocam danos aos componentes celulares como proteínas, lipídeos de membrana e ácidos nucleicos, resultando em disfunção e, eventualmente morte celular. Isto implica na etiologia de grande número de doenças crônicas degenerativas, incluindo aterosclerose, câncer, diabetes e envelhecimento (BRAY, 2000). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a formação dessas espécies reativas de oxigênio.

A β -oxidação excessiva de ácidos graxos, em decorrência de elevada lipólise, observada no DM1, aumenta a produção de equivalentes redutores NADH e FADH₂, os quais liberam elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, contribuindo para elevar a formação de EROs (KUROKI et al., 2003; VOET et al., 2008). A redução incompleta do oxigênio molecular na cadeia transportadora de elétrons, acoplada a fosforilação oxidativa, resulta na geração de ânions superóxidos ($\bullet\text{O}_2^-$) (SEIVA et al., 2009). Além do ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), pode-se citar outras EROs como os radicais livres hidroxil ($\bullet\text{OH}$), peroxil ($\bullet\text{RO}_2$), hidroperoxil ($\bullet\text{HRO}_2$) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). (JOHANSEN et al., 2005; FORBES et al., 2008).

A formação excessiva de radicais livres no DM pode ocorrer como resultado da auto-oxidação da glicose e subseqüentemente formação de produtos finais de glicação avançada (AGES), glicação de proteína não enzimática e aumento do influxo de glicose para a via polioliol (BROWNLEE, 2001; MARITIM et al., 2003). Os AGEs são proteínas ou lipídeos que se tornam glicosados após a exposição da glicose oxidada e, contribuem para o desenvolvimento de aterosclerose. Acredita-se que atuam modificando a estrutura das proteínas intracelulares envolvidas na regulação gênica; em moléculas da matriz extracelular, interferindo na sinalização entre as células. O aumento da glicose intracelular tem como consequência a metabolização final de frutose-6-fosfato à uridina difosfato-N-acetil glucosamina (UDPGlcNAc), resultando em alterações patológicas na expressão gênica, aumentando a produção de citocinas inflamatórias e fatores de transcrição (DU et al., 2000).

Elevadas concentrações de glicose podem ser metabolizadas através da via polioliol (figura 1), onde a glicose é reduzida pela aldose redutase em sorbitol, o qual é convertido em frutose pela sorbitol desidrogenase. Nesta via o NADPH é oxidado, ocasionando baixa concentração da glutathione na forma reduzida, que atua como agente importante na proteção dos danos provocados pelos radicais livres (BROWNLEE 2001; EL-KABBANI et al., 2004; FORBES et al., 2008).

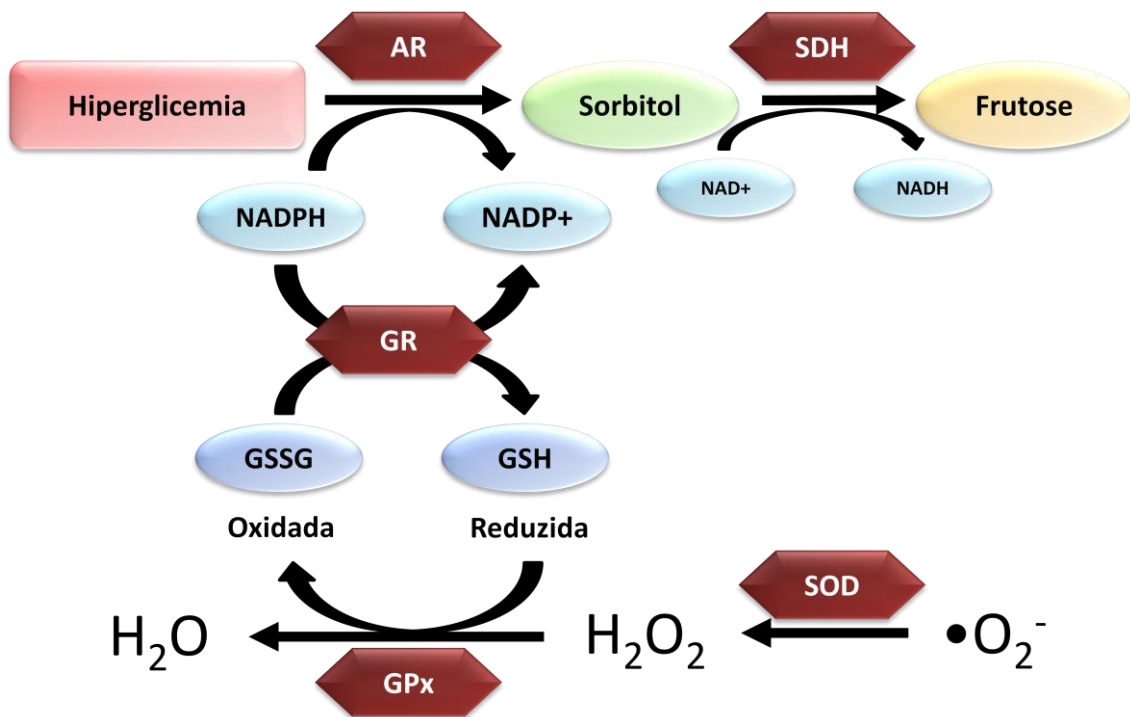


Figura 1: Via do poliol em condições de hiperglicemia.

Aldose redutase (AR) reduz glicose à sorbitol, utilizando NADPH como co-fator. A baixa concentração de NADPH compromete a oxidação da glutathiona reduzida (GSH), estabelecendo o estresse oxidativo. Sorbitol desidrogenase (SDH) oxida sorbitol à frutose utilizando NAD⁺ como co-fator. (Adaptação Reis et al., 2008)

Existem basicamente dois sistemas antioxidantes que neutralizam a ação de EROs, o enzimático e não-enzimático (HALLIWELL, 1992; HALLIWELL, 1996; SIES, 1997). Os primeiros correspondem às enzimas catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px). Os agentes não-enzimáticos correspondem principalmente, a glutathiona, vitaminas C e E (α -tocoferol) (KRINSKY et al., 1992; SAXENA et al., 1993; KAKKAR et al., 1995; MARITIN, 2003).

Quando há formação excessiva de ERO e/ou remoção insuficiente, pela diminuição das defesas antioxidantes, o equilíbrio oxidante/antioxidante é alterado e as EROs podem exercer seus efeitos deletérios. Este desequilíbrio entre a formação

e neutralização de ERO constitui o estresse oxidativo (NISHIYAMA et al., 1998; PHILLIPS et al., 2004).

Desde que a hiperglicemia está associada à produção excessiva de ERO, que excede a capacidade natural do sistema antioxidante, o estresse oxidativo desempenha papel importante na progressão e complicações do DM (BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2000; UGOCHUKWU; COBOURNE, 2003; NOGUEIRA et al., 2005; SIMMONS, 2006).

Dentre as complicações do DM1, as doenças cardiovasculares são as que representam maior índice de mortalidade entre os pacientes diabéticos. Anormalidades cardiovasculares associadas ao DM1 podem resultar em aterosclerose, bem como alterações intrínsecas no músculo cardíaco, uma condição que tem sido referida como cardiomiopatia (FISHER; FRIER, 1990).

O miocárdio é caracterizado por elevada capacidade oxidativa (STANLEY; SABBAH, 2005) com grande quantidade de mitocôndrias e, possui elevada taxa de consumo de oxigênio, uma vez que utiliza os ácidos graxos como principal substrato para produção de energia (LOPASCHUK et al., 2002). E, assim há produção de equivalentes redutores (NADH e FADH₂) em proporções elevadas, contribuindo para aumentar a fonte de EROs.

A hiperglicemia observada no DM1 está intimamente relacionada com a dislipidemia, ou seja, aumento da concentração de LDL-colesterol e triacilgliceróis e, redução da HDL-colesterol, elevando o risco de doenças isquêmicas cardiovasculares e cerebrovasculares. Por outro lado, a susceptibilidade da LDL a glicação e oxidação parece estar relacionada ao controle glicêmico inadequado e pela redução no sistema de defesa antioxidante, observada no DM1. Desta forma, o

controle da glicemia é determinante como fator benéfico, pois diminui o estresse oxidativo e reduz a aterogênese diabética. (JOHANSEN et al., 2005).

Estudos sugerem que o estresse oxidativo e alterações no metabolismo energético constituem importantes fatores para desencadear alterações cardiovasculares. A cardiomiopatia diabética é originada como sendo resultado de complexas relações entre anormalidades metabólicas que acompanham o diabetes e suas consequências celulares, levando a alterações tanto na estrutura como na função do tecido cardíaco (BOUDINA; ABEL, 2007).

A utilização de antioxidantes tem despertado interesse na clínica devido aos efeitos benéficos sobre as doenças cardiovasculares. Estudos epidemiológicos demonstraram correlação inversa entre distúrbios cardiovasculares e consumo de dietas ricas em antioxidantes. Verificou-se aumento séricos de HDL-colesterol e diminuição tanto na concentração de triacilgliceróis como de LDL-colesterol (AHLENSTIEL et al., 2003).

Deste modo, estudos com intervenção farmacológica baseada em compostos antioxidantes sobre o DM são de grande interesse (OBERLEY, 1988). Os antioxidantes dietéticos desempenham papel importante na defesa frente às enfermidades crônicas degenerativas como o DM. É notório que estas substâncias atuam neutralizando as EROs, envolvidas no estresse oxidativo e, desta forma, impedem a propagação e as complicações diabéticas. Assim, a suplementação com antioxidantes pode apresentar efeito benéfico, por evitar a morbimortalidade em pacientes diabéticos (BROWN; HU, 2001; CERIELLO; TESTA, 2009) de tal forma, que poderiam prevenir e/ou retardar o desenvolvimento das complicações diabéticas (CERIELLO; MOTZ, 2004). Desde que o sistema antioxidante torna-se ineficaz ao compensar à produção excessiva de ERO, favorecendo, portanto, o estresse

oxidativo, a administração de antioxidantes pode ser efetiva no controle do DM1. Estudos epidemiológicos estabeleceram que a ingestão de antioxidantes encontra-se relacionada inversamente com a ocorrência de doenças promovidas pelas EROs (BAYNES; THORPE, 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; SADE et al., 2012).

Portanto, com a finalidade de estudar substâncias que apresentem atividade antioxidante, literatura relata algumas propriedades terapêuticas do resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene). Trata-se de um composto pertencente ao grupo das fitoalexinas polifenóis encontrado em diversos vegetais, em especial as uvas. Possui diversos efeitos farmacológicos, incluindo ação antioxidante, antihiperlipidêmica, anti-inflamatório, anticarcinogênico e atividade cardioprotetora. Estudos em animais têm demonstrado o potencial efeito benéfico do resveratrol sobre as desordens metabólicas, observadas no DM1 (BAUR et al., 2006; PALSAMY; SUBRAMANIAN, 2008).

A atividade antioxidante do resveratrol pode ser conferida tanto pela sua habilidade em neutralizar os radicais livres, pela presença do grupo hidroxil na posição 3' de sua molécula, como pela capacidade em aumentar as defesas endógenas antioxidantes (BAUR; SINCLAIR 2006). A geração de oxidantes (EROs), como ânion superóxido, pela via hipoxantina/xantina oxidase diminuiu com o suprimento de resveratrol (BAUR & SINCLAIR 2006, CHEN et al, 2011), além de aumentar a atividade da catalase e diminuir a peroxidação de lipídios e de outras macromoléculas (WYKE; TISDALE 2006).

Por outro lado, Lagouge, et al. (2006) e Chen et al. (2011) relataram que o resveratrol aumentou a biogênese mitocondrial, o que indicou melhora na função mitocondrial tanto no fígado como no músculo esquelético.

Estudos demonstraram os possíveis mecanismos de ação do resveratrol tanto como antioxidante como hipoglicemiante. O seu efeito sobre a função celular, associou-se a ativação da proteína Sirtuina 1 – classe de proteínas que apresentam sítios acetilase NAD⁺ dependente e mono-ribosiltransferase - envolvida especificamente na expressão gênica de isozimas da MnSOD, a qual é essencial na manutenção da função mitocondrial e diminuição do estresse oxidativo. Esta proteína também esteve associada ao aumento da atividade da catalase (YAMAMOTO; SADOSHIMA, 2011; YING et al., 2012).

A atuação do resveratrol pode estar associada tanto a expressão como a translocação da GLUT 4. (THORENS; MUECKLER, 2010). Segundo Deng et al., (2008) o resveratrol estimulou a internalização celular da glicose no músculo sóleo ao aumentar o deslocamento da GLUT 4 para a membrana plasmática, além de aumentar a fosforilação de receptores de insulina.

Segundo Slot et al. (1991) e Martin et al. (2000) a concentração plasmática de insulina pode influenciar a quantidade de GLUT 4. Aproximadamente apenas 5% do número de GLUT 4 está presente na célula em condições de hipoinsulinemia.

Assim com a ação e/ou secreção insuficiente de insulina, no DM, a translocação da GLUT4 para a membrana é ineficiente, contribuindo para o estabelecimento da hiperglicemia e disfunção no metabolismo energético do músculo cardíaco e esquelético, os quais são responsáveis por cerca de 90% da captação de glicose e, portanto, dependentes de insulina (KRAEGAN, et al., 1985).

Estudos demonstraram que resveratrol possui estrutura similar ao estrógeno sintético (diethylbestrol), especificamente no sítio de transcrição gênica da ativação e ligação com o seu receptor localizado em células alvo.

Deng et al. (2008) relataram aumento da captação de glicose na presença resveratrol, através da translocação da GLUT4, para a membrana plasmática e, fosforilação dos receptores de insulina. Segundo mecanismo proposto pelos autores, o resveratrol, se ligando ao receptor de estrógeno, ativa a proteína quinase p38 e Erk, envolvidas no processo de translocação da GLUT4 e sinalização da insulina (Figura 2). Verificou-se que com a inibição da proteína p38, a translocação da GLUT4 não ocorre, mesmo que o resveratrol permaneça ligado ao receptor de estrógeno, comprovando, desta forma, que a sua ação é dependente da via intracelular envolvendo a proteína quinase p38. Concluíram que os receptores de estrógeno são ativados quando ligados ao resveratrol e, desta forma a proteína quinase p38 promove a translocação do GLUT 4 e a captação de glicose. Assim, o resveratrol pode atuar também como agente hipoglicemiante.

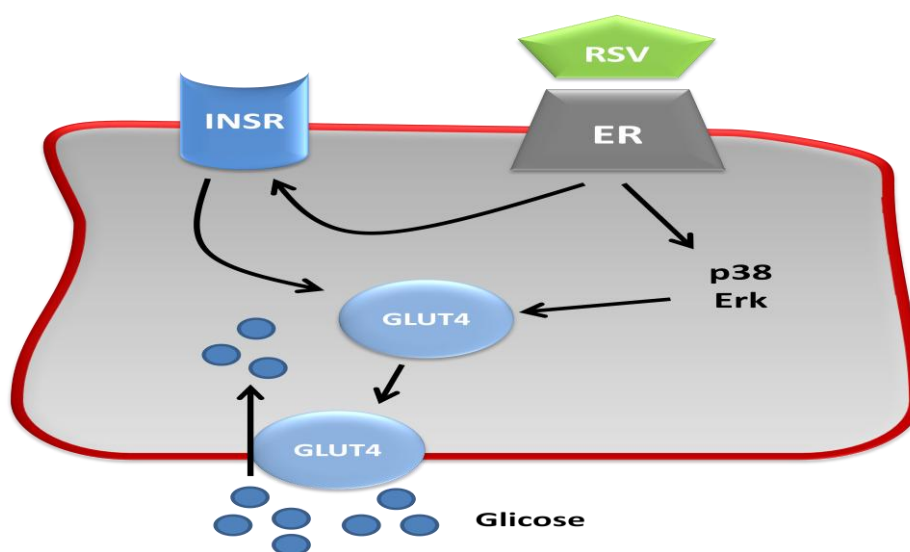


Figura 2: Modelo proposto para explicar um dos possíveis mecanismos de ação do RSV durante a captação de glicose e fosforilação do receptor de insulina (INSR). RSV apresenta similaridades químicas com o estrógeno exógeno, ligando-se em receptor de estrógeno (ER), ativando a proteína quinase p38 e Erk/2. A ativação do ER por RSV é essencial para a ativação da cascata de sinalização e ativação de p38, Erk e fosforilação do INSR. (Adaptação Deng et al., 2008).

Hipótese

O tratamento com resveratrol apresenta efeito antidiabetogênico, melhora o perfil lipídico, normaliza o metabolismo energético e controla o estresse oxidativo no tecido cardíaco de ratos com *Diabetes mellitus* tipo1, induzido experimentalmente.

Objetivos

OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICO

Considerando-se a prevalência do DM1 e as propriedades biológicas do resveratrol, e tendo em vista a importância de tratamentos alternativos que reduzem as taxas de recorrência e progressão das complicações diabéticas, o objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito do resveratrol sobre as alterações metabólicas e o estresse oxidativo, bem como a forma de ação deste antioxidante através da expressão da SIRT1 em miocárdio de ratos com DM1. Tal objetivo geral foi alcançado através dos seguintes objetivos específicos:

- Determinar os parâmetros nutricionais, hiperglicemia e dislipidemia promovida pelo DM1;
- Evidenciar o efeito do DM1 sobre o estresse oxidativo (biomarcadores) e metabolismo energético no tecido cardíaco;
- Analisar o efeito anti-diabetogênico do resveratrol sobre a concentração sérica de glicose, peso corporal, controle alimentar e de água em ratos com DM1;
- Identificar os efeitos da administração do resveratrol sobre a dislipidemia, metabolismo energético e estresse oxidativo (biomarcadores) em miocárdio de ratos diabéticos.
- Identificar, por meio de *Western Blotting* a expressão da SIRT1 no tecido cardíaco e associá-la ao tratamento do DM1 com resveratrol.

Material e Métodos

1. INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO E ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 32 ratos (*Rattus norvegicus*), raça *wistar*, machos, com peso inicial em média de 250g, com 30 dias de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico, em ambiente com temperatura ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (ciclos 12:12 horas claro/escuro) controlados. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP - Campus de Botucatu e transferidos para o Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Química e Bioquímica/IB-UNESP-Botucatu. O protocolo experimental foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal do Instituto de Biociências/UNESP "Campus de Botucatu", adotado pelo Colégio Brasileiro de experimentação animal (COBEA.)

2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos aleatoriamente e constituíram os seguintes grupos experimentais ($n=8$):

- G_1 = ratos normais que receberam apenas ração comercial e água;
- G_2 = ratos normais que receberam ração comercial, água e resveratrol;
- G_3 = ratos diabéticos que receberam ração comercial e água;
- G_4 = ratos diabéticos que receberam ração comercial, água e resveratrol.

O DM1 experimental foi induzido através da administração intraperitoneal de estreptozotocina (STZ - 60 mg/kg de peso corporal; dose única) diluído em citrato de sódio (0,1M pH 4,5). Após 48 horas da administração da STZ, a glicemia foi determinada através de glicosímetro (Advantage) em amostras de sangue retiradas por punção da cauda.

Com o estabelecimento do estado diabético, o resveratrol (RSV) foi administrado através da via intragástrica (gavagem). Os animais pertencentes aos

grupos G₂ e G₄ receberam RSV (SIGMA – R 5010) na concentração de 1,0 mg/kg/dia - diluído em etanol (50mg/mL) e em seguida acrescentou-se água (q.s.p 1mL), segundo Bradamente et al. (2003) e Rocha, et al. (2011) durante 30 dias. Os animais receberam água e ração comercial (Purina Labina, Campinas-SP) *ad libitum* durante o período experimental. O controle de ingestão de água e de ração foi realizado diariamente e a pesagem dos animais foi efetuada semanalmente.

3. PARÂMETRO NUTRICIONAL

Considerando o consumo alimentar médio diário e a quantidade de energia ingerida, calculou-se a energia ingerida, segundo Ebaid et al. (2006):

- Energia Ingerida (EI; kcal/dia) = consumo médio de ração x energia metabolizável (3,81 kcal/g);

4. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS SÉRICAS E CARDÍACAS

No final do período experimental (30 dias), os animais foram anestesiados (cloridrato de cetamina 10% e, 0,1 mL/100g de peso corporal, i.p.) e a eutanásia foi realizada por decapitação. O sangue foi coletado e o soro separado por centrifugação (6000 rpm, por 15 minutos) e utilizado para determinação, glicose, triacilgliceróis, colesterol total, HDL-colesterol, VLDL-colesterol, bem como a atividade da lactato desidrogenase (LDH). Após a retirada do sangue, o coração foi imediatamente retirado e lavado em tampão fosfato (9%). Amostras, de aproximadamente 200mg de tecido cardíaco (ventrículo esquerdo) foram estocadas em “freezer” à -80°C para as determinações dos biomarcadores do estresse oxidativo, enzimas do metabolismo energético, concentração de proteínas totais e glicogênio.

5. GLICEMIA E LIPIDEMIA

5.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE

A glicose sanguínea, por ação da glicose-oxidase, é oxidada a ácido glicônico e forma peróxido de hidrogênio. Este peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formado reage por ação da peroxidase com 4-aminoantepirina e com 1,4-diclorofenol. Por junção oxidativa forma-se aintipirilquinonimina, de cor vermelha. A intensidade de coloração foi proporcional à concentração de glicose (MOURA, 1982).

5.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS

Os triacilgliceróis foram determinados através de sua hidrólise enzimática produzindo glicerol e ácidos graxos. Segundo Soloni (1971), o glicerol oxida-se com ácido periódico a formaldeído, o qual foi quantificado colorimetricamente como 3,5 diacetil-1,4 diidrolutidina.

5.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO COLESTEROL TOTAL

O colesterol total foi determinado enzimaticamente pela colesterol oxidase com hidrólise enzimática prévia dos ésteres mediante uma lipase. A água oxigenada liberada na oxidação produz fenol oxidado e 4-aminofenazona, catalisada pela peroxidase, com formação de quinonimina vermelha (MOURA, 1982).

5.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HDL-COLESTEROL

A lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL-colesterol) e a lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) foram precipitadas seletivamente pelo ácido fosfotungstíco. No sobrenadante, separado por centrifugação, encontram-se as

lipoproteínas de alta densidade (HDL-colesterol), onde se determinará o colesterol incorporado às mesmas (LOPES-VIRELLA et al., 1977).

5.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE VLDL-COLESTEROL

O valor de VLDL-colesterol foi obtido pela equação de Friedewald (COHN; ROTH, 1996).

6. ANÁLISES NO TECIDO CARDÍACO

As amostras de aproximadamente 200mg de tecido cardíaco (ventrículo esquerdo) foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,01M; pH 7,0) e o homogeneizado centrifugado a 12 000 x g, durante 30 minutos, a -4°C (PEREIRA et al., 1998). O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração das proteínas totais, hidroperóxido de lipídio, glutathiona total e reduzida, atividade das enzimas antioxidantes e do metabolismo energético.

6.1. ANÁLISE DO METABOLISMO ENERGÉTICO

O metabolismo energético foi analisado através das enzimas reguladoras das vias metabólicas, tais como lactato desidrogenase associadas ao metabolismo aeróbico, citrato sintase importante reguladora do metabolismo do miocárdio e controla o fluxo de metabólitos através do ciclo do ácido cítrico e marcadora do metabolismo aeróbico e a β -hidroxiacil-CoA desidrogenase reguladora da β -oxidação de ácidos graxos.

6.1.1. ATIVIDADE DA LACTATO DESIDROGENASE

A atividade da lactato desidrogenase foi determinada segundo técnica de Wilkinson et al. (1965) utilizando o método UV otimizado, onde foi medido o consumo de NADH_2 , o qual foi proporcional à atividade da enzima presente na amostra.

6.1.2. ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE

A citrato sintase foi determinada a 412nm em tampão tris-HCl 50mM, pH 8,0, contendo acetil-CoA, DTBN (dithiobis-2-nitrobenziato) e oxaloacetato (BASS et al., 1969).

6.1.3. ATIVIDADE DA β -HIDROXIACIL COENZIMA A DESIDROGENASE

Atividade da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (OHADH) foi determinada em meio contendo acetoacetil coenzima A e NADH, o qual teve sua oxidação medida (BASS et al., 1969).

6.1.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO GLICOGÊNIO

Na determinação do glicogênio, amostras de 200mg de tecido cardíaco foram homogeneizadas (3000 rpm por 10 minutos) com ácido perclórico (0,6 mol/L). Do sobredanadante retirou uma alíquota (10 μ L) para determinar a concentração inicial de glicose e, o restante recebeu amiloglicosidase em meio contendo tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 4,5) a 50°C, nesta mistura reativa determinou a concentração final de glicose. A concentração de glicogênio foi calculada pela diferença entre as concentrações de glicose final e inicial, segundo Roehrig e Allred (1974). A concentração de glicose foi determinada segundo Moura (1982).

6.2. ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

A análise do estresse oxidativo foi realizada através da concentração de glutathiona reduzida e total, hidroperóxido de lipídio e atividade das enzimas antioxidantes.

6.2.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA GLUTATIONA TOTAL E REDUZIDA

A concentração de glutathiona total foi determinada através do método cinético, com a redução do 5,5'-Dithio (2 *nitrobenzoic acid*) (DTNB) pela glutathiona reduzida (GSH) na presença de NADPH (TIETZE, 1969). A concentração de glutathiona reduzida foi determinada em tampão tris-HCl pH 8,9 e DTNB, após prévia precipitação com TCA 50%. O GSH foi utilizado como padrão (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

6.2.2. 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 alaranjado de xilenol e forma cromógeno, cuja intensidade de coloração foi medida espectrofotometricamente (JIANG et al., 1991).

6.2.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE GLUTATIONA PEROXIDASE

A atividade da glutathiona peroxidase foi determinada segundo método de Nakamura et al. (1974) na presença de peróxido de hidrogênio. A mistura reativa foi preparada em tampão fosfato de sódio, $NADPH_2$, azida sódica, EDTA, glutathiona

reduzida (GSH) e glutathiona redutase. Através da oxidação do NADPH₂ na presença da glutathiona redutase, a qual catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG), determinou-se a atividade da GSH-Px.

6.2.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE SUPERÓXIDO DISMUTASE

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela técnica de Crouch et al. (1981), tendo como base a capacidade da enzima inibir a redução do nitroblue-tetrazólico (NBT) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino (pH 10). A hidroxilamina gera fluxo de O₂⁻ do NBT para blue-formazana em temperatura ambiente. Quando a amostra foi adicionada, a velocidade de redução do NBT foi inibida, de acordo com atividade da SOD na amostra.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com controle de temperatura (UV/visível *Ultrospec com Swift II software*, Cambridge, England, UK) e em leitor de microplaca (μ Quant-MQX 200 Bio-Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com controle através do software Kcjunior (Bio-Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Todos os reagentes tiveram procedência da Sigma (St, Louis, USA).

6.3.. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DA SIRT 1

A expressão da SIRT1 foi avaliada através do método *immunoblotting* (*western blotting*). O tecido cardíaco foi homogeneizado a 4°C em tampão RIPA (BioRad®, Bio Rad Laboratories, USA) e Coquetel inibidor de proteases (Sigma, St Louis, MOm USA) em homogeneizador do tipo Tureaux em três ciclos de cinco segundos e homogeneizado foi centrifugado a 14.000 rpm (4°C/20 minutos), cujo sobrenadante foi recolhido. A quantificação da proteína SIRT1 foi realizada em leitor

ELISA, em alíquotas (70-150 µg de proteína) presentes em solução tampão (*Laemli sample buffer – Bio-Rad*) e β-mercaptoetanol, a 95°C por 3-5 minutos. Em seguida, as proteínas foram separadas por eletroforese vertical (*Mini-Protean, Bio Rad®*) em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e após, transferidas para a membrana de nitrocelulose ou PVDF (pré-tratamento em metanol 100%, água e tampão PBST – *phosphate buffered saline-tris*) em sistema Semi-Dry de transferência. A ligação inespecífica de proteínas foi bloqueada através da exposição das membranas em BSA (*bovine serum albumin*) a 3% em tampão PBS (*phosphate buffered saline*), por 1 hora, em temperatura ambiente. As membranas foram subsequentemente incubadas com o anticorpo primário anti-SIRT1 (*Abcam, ab110304*) em BSA 1% diluído em PBST *overnight* e lavado em PBST 3 vezes. Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário *HRP-antimouse* específico, diluído BSA 1%, por 2 horas, e posteriormente lavadas por 3x com PBST. Os componentes imunorreativos foram revelados a partir de substratos quimioluminescentes. As bandas obtidas foram submetidas a análise semi-quantitativa por densitometria óptica (*Software Scion for Windows ®*), segundo Scarano, et al., (2009).

7. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS - PROCEDIMENTO ESTATÍSTICO

Para as variáveis bioquímicas estudadas foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 8 repetições, segundo esquema da análise de variância (ANOVA):

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	G.L.
TRATAMENTOS	3
RESÍDUO	29
TOTAL	32

O nível de significância adotado nas análises estatísticas foi de 5% de probabilidade e as estatísticas F foram significativas quando $p \leq 0.05$. Foi utilizado Teste de Tukey para a comparação entre as médias (ZAR, 1996).

Os resultados obtidos para expressão da SIRT 1 foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann-Whitney com análise estatística F considerando $p \leq 0.05$.

Resultados

O consumo tanto alimentar como de água pelos animais diabéticos não tratados (G3) foi maior ($p < 0.05$) em comparação aos demais grupos. Embora a administração de RSV tenha diminuído a quantidade de ração ingerida e o consumo de água em animais diabéticos (G4), não foi suficiente em reduzir aos valores obtidos para os animais do grupo controle (G1-Tabela1). Nota-se que a energia ingerida também foi elevada em G3 e apresentou queda ($p < 0.05$) com a administração de RSV (Tabela 1 e Figura 3).

Quanto ao peso corporal, não houve diferença significativa entre os grupos controle (G1) e tratados com RSV (G2). Porém, animais diabéticos não tratados (G3) demonstraram redução no peso corporal no final do período experimental, comparativamente aos demais grupos. Ao passo que, os animais do grupo G4 apresentaram aumento significativo no peso corporal em relação aos animais do grupo G3 (Tabela 1 e Figura 4).

TABELA 1. Resultados médios obtidos para consumo alimentar, consumo de água, energia ingerida e peso corporal para os diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
Consumo alimentar <i>g/d</i>	27,82±0,04b	26,96±0,14a	42,81±0,17d	38,30±0,89c
Consumo de água <i>mL/d</i>	39,87±2,08a	40,05±0,36a	206,51±11,67c	164,85±14,5b
Energia Ingerida <i>Kcal/d</i>	106,28±0,18b	103,00±0,56a	163,57±0,65d	146,31±3,20c
Peso corporal <i>g</i>	394,36±25,10c	381,88±36,56c	188,61±33,06a	257,09±51,29b

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). G1= controle; G2= RSV; G3= diabéticos; G4= diabéticos + RSV.

FIGURA 3. Valores médios obtidos para energia ingerida (Kcal/d).

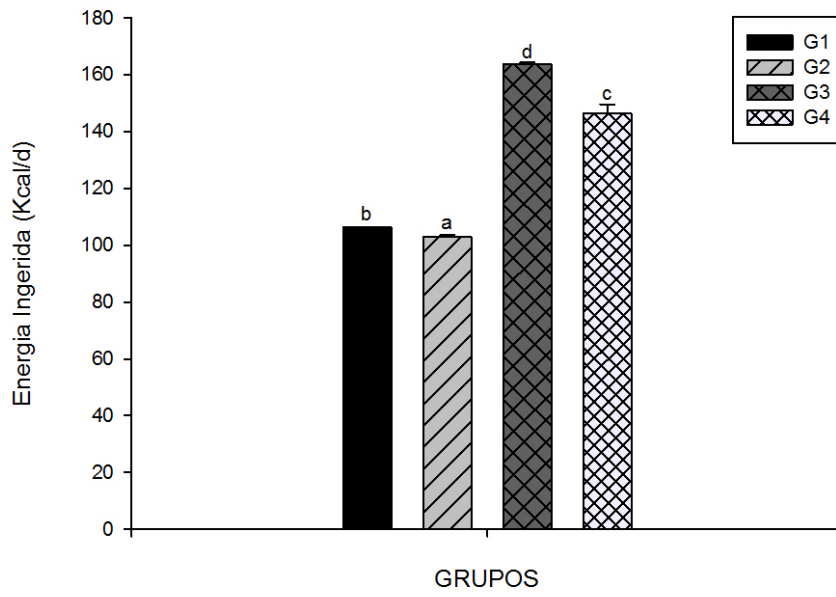
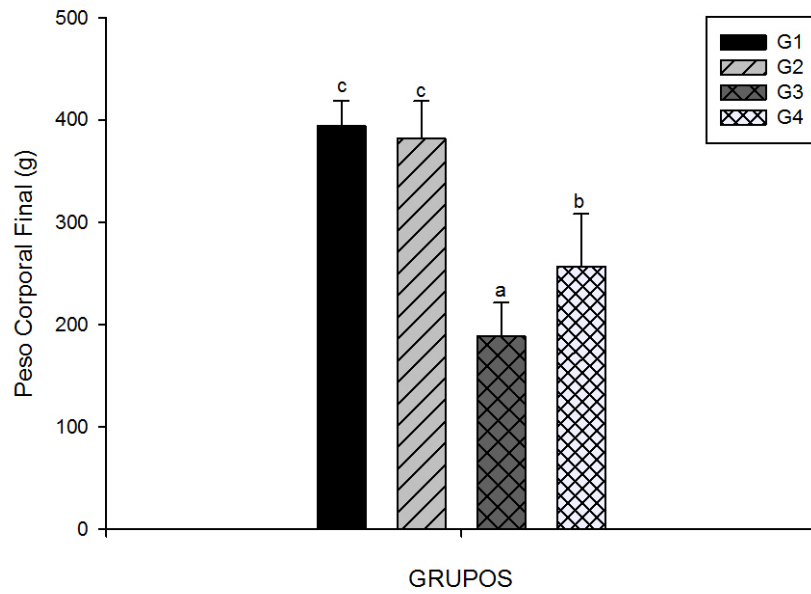


FIGURA 4. Valores médios obtidos para peso corporal final.



A Tabela 2 mostra a glicemia e o perfil lipídico no soro dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. Pode-se verificar que os animais diabéticos apresentaram aumento na concentração sérica de glicose, comparativamente aos demais grupos. A administração de RSV em animais diabéticos demonstrou redução significativa neste parâmetro comparado ao G3, porém não apresentou alterações significantes em comparação aos grupos G1 e G2, os quais não diferiram entre si (Figura 5). Animais diabéticos submetidos ao tratamento com RSV (G4) apresentaram redução do nível sérico de colesterol total, comparativamente aqueles diabéticos não tratados (G3). Nota-se que não houve alterações significantes na concentração de colesterol total entre os grupos G1, G2 e G3 (Tabela 2 e Figura 6).

A concentração tanto de triacilgliceróis como de VLDL-colesterol não diferiu de forma significativa entre os grupos G3 e G4. Animais não diabéticos suplementados com RSV (G2) demonstraram maior nível sérico de triacilgliceróis e VLDL-colesterol em relação ao grupo G1, o qual não diferiu dos grupos G3 e G4 (Tabela 2 e Figura 6).

Como demonstrado na Tabela 2 e Figura 6, animais que receberam estreptozotocina (G3) apresentaram diminuição ($p < 0.05$) na concentração sérica de HDL-colesterol, em relação aos demais grupos experimentais, os quais não mostraram diferenças significantes.

TABELA 2. Resultados médios obtidos para a concentração sérica de glicose, colesterol total, triacilgliceróis (TG), VLDL-colesterol (VLDL) e HDL-colesterol (HDL) para os diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
Glicose mg/dL	123,09±19,75a	132,03±40,30a	471,06±73,26b	161,40±27,91a
Colesterol total mg/dL	79,82±8,28ab	81,11±12,50ab	105,02±33,07b	70,37±11,77a
Triacilgliceróis mg/dL	131,67±19,75a	188,62±34,19b	161,59±27,94ab	140,40±18,90a
VLDL mg/dL	26,33±3,95a	37,72±6,84b	32,32±5,59ab	30,17±7,70ab
HDL mg/dL	52,03±14,08b	61,66±7,58b	28,53±10,20a	58,61±22,62b

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). G1= controle; G2= RSV; G3= diabéticos; G4= diabéticos + RSV.

FIGURA 5. Valores médios obtidos para glicose sérica (mg/dL).

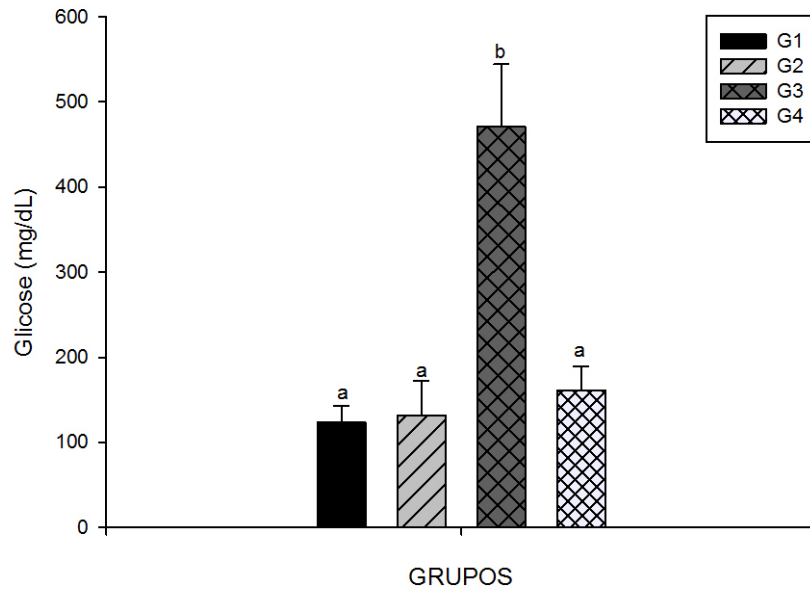
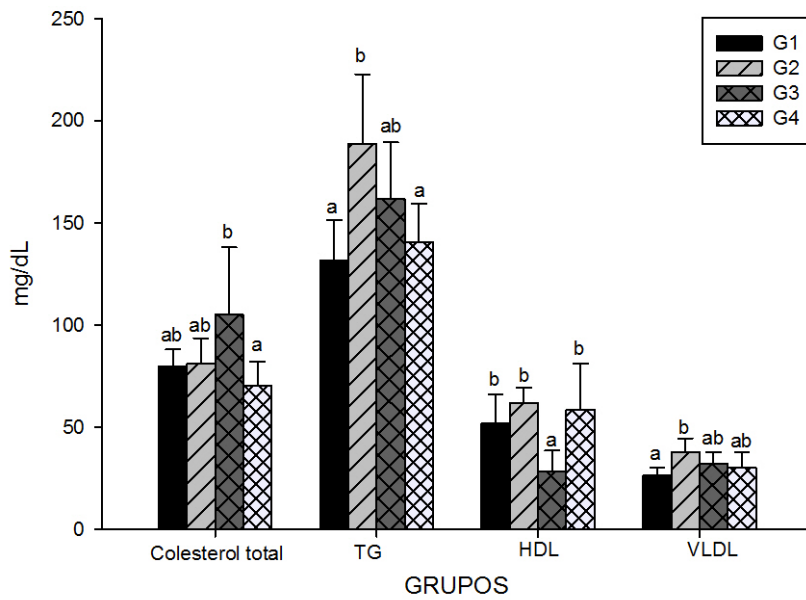


FIGURA 6. Valores médios obtidos para concentração sérica de colesterol total, VLDL-colesterol, HDL-colesterol e triacilgliceróis (mg/dL).



Não houve diferenças significativas para a concentração sérica de proteínas totais entre os grupos experimentais (Tabela 3, Figura 7).

Animais diabéticos mostraram aumento significativo para o nível sérico de ureia. Enquanto aqueles diabéticos tratados com RSV, apresentaram redução neste parâmetro nitrogenado, porém sem atingir os valores obtidos para os animais do grupo controle (G1 – Tabela 3; Figura 8).

Na Tabela 3 e Figura 9, observa-se que RSV diminuiu a concentração de creatinina no soro de animais diabéticos (G4) ou normais (G2). Nota-se que não houve alterações significantes no nível séricos de creatinina entre os grupos G1 e G3.

O grupo diabético não tratado (G4) apresentou atividade sérica de lactato desidrogenase estatisticamente maior em relação aos demais grupos. Embora a suplementação de RSV em animais diabéticos tenha reduzido a atividade da lactato desidrogenase, esta não atingiu os valores obtidos para G1, o qual não diferiu de G2 (Tabela 3 e Figura 10).

TABELA 3. Resultados médios obtidos para a concentração sérica de proteínas totais (Pt), uréia, creatinina e lactato desidrogenase (LDH) para os diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
Proteínas totais g/dL	6,67±0,76a	5,42±0,75a	5,62±1,08a	5,29±1,52a
Ureia mg/dL	48,11±14,27a	64,53±9,09ab	124,09±11,42c	78,84±32,29b
Creatinina mg/dL	3,13±0,57bc	2,25±0,68a	3,66±0,23c	2,37±0,80ab
LDH nmol/L	107,22±13,85a	97,02±12,04a	185,76±18,20c	147,42±17,97b

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). G1= controle; G2= RSV; G3= diabéticos; G4= diabéticos + RSV.

FIGURA 7. Valores médios obtidos para concentração sérica de proteínas totais (g/dL).

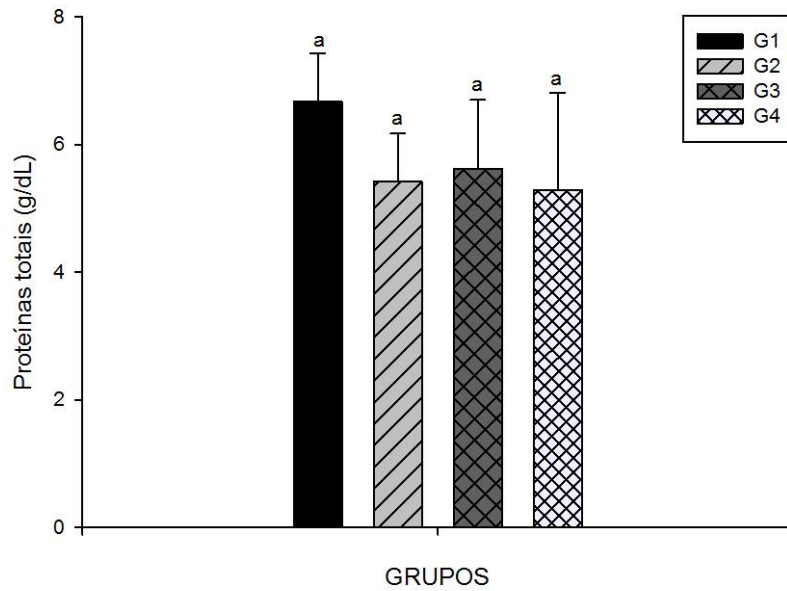


FIGURA 8. Valores médios obtidos para concentração sérica de uréia (mg/dL).

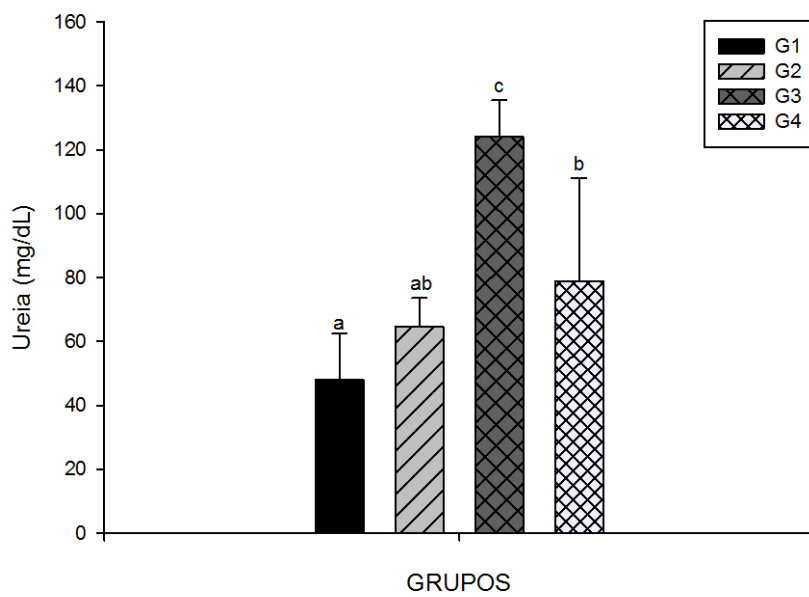


FIGURA 9. Valores médios obtidos para concentração sérica de creatinina (mg/dL).

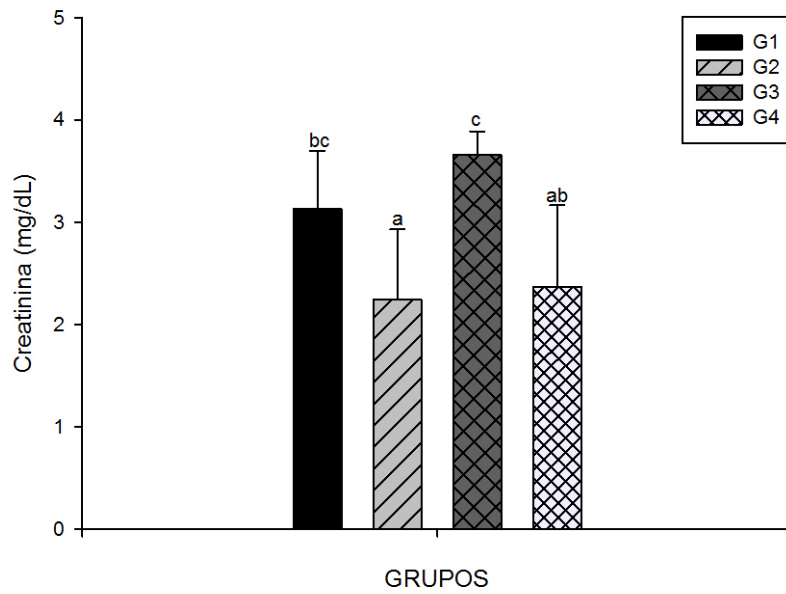
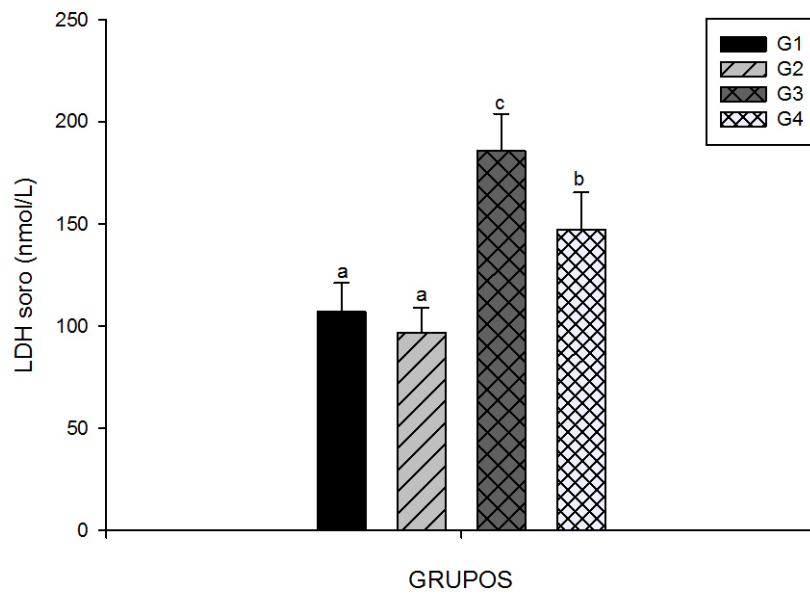


FIGURA 10. Valores médios obtidos para concentração sérica de LDH (nmol/L).



A Tabela 4 apresenta a atividade das enzimas marcadoras do metabolismo energético cardíaco. Não foram observadas diferenças significativas na atividade da enzima LDH entre os grupos experimentais (Figura 11).

A atividade da enzima citrato sintase (Figura 12) foi maior no grupo G3 ($p < 0.05$), em relação aos demais grupos. E pode-se verificar que RSV causou diminuição na atividade desta enzima em animais diabéticos (G4). No entanto, não foi possível observar diferença significativa entre este grupo e aqueles considerados normais que receberam apenas RSV.

Nota-se que a atividade da OHADH esteve elevada ($p < 0.05$) no tecido cardíaco dos animais submetidos ao diabetes experimental (G3). Entretanto, o tratamento com RSV evitou o aumento da atividade OHADH em animais diabéticos pertencentes ao grupo G4, o qual não diferiu de G1 e G2 (Tabela 4; Figura 12).

TABELA 4. Resultados médios obtidos para a concentração cardíaca de lactato desidrogenase (LDH), citrato sintase (CS) e β -Hidroxiacil CoA desidrogenase (OHADH), para os diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
LDH <i>nmol/g tecido</i>	115,57±24,94a	111,52±22,39a	105,02±14,43a	114,86±29,59a
CS <i>nmol/mg tecido</i>	108,64±19,07a	120,32±17,45ab	164,42±18,86c	137,47±16,39b
OHADH <i>nmol/mg tecido</i>	133,10±6,73a	136,25±6,48a	173,78±9,57b	140,07±6,97a

Médias \pm Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). G1= controle; G2= RSV; G3= diabéticos; G4= diabéticos + RSV

FIGURA 11. Valores médios obtidos para concentração tecidual de LDH (nmol/g tecido).

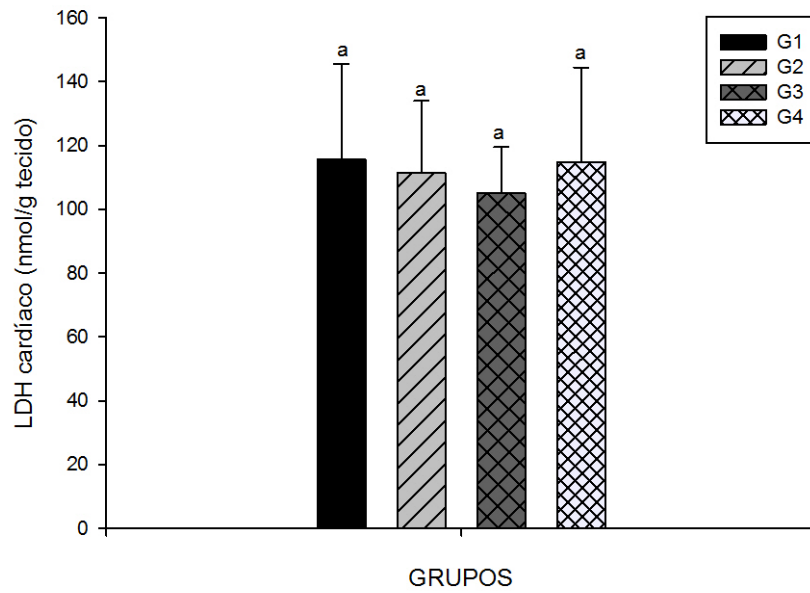
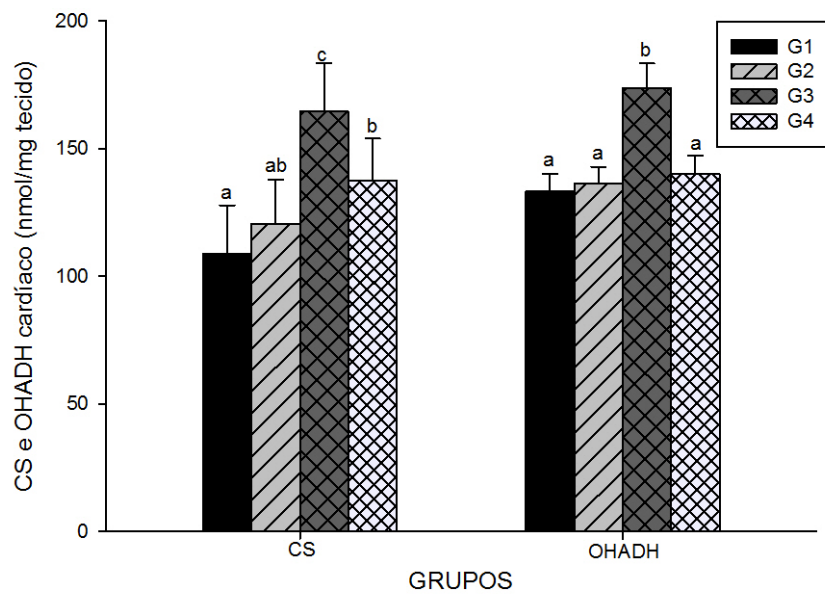


FIGURA 12. Valores médios obtidos para concentração tecidual de CS e OHADH (nmol/mg tecido).



A concentração de glicogênio apresentou-se diminuída sob estado diabético, enquanto a suplementação de RSV foi suficiente para elevar, de forma significativa, a quantidade deste polissacarídeo no tecido cardíaco de animais diabéticos, obtendo valores próximos aos obtidos pelos animais dos grupos G1 e G2 (Tabela 5; Figura 13). Não foram observadas alterações ($P>0.05$) no conteúdo de proteínas totais no miocárdio (Tabela 5; Figura 14).

TABELA 5. Resultados médios obtidos para a concentração cardíaca de glicogênio e proteínas totais para os diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
Glicogênio mg/g tecido	50,35±3,11b	58,80±7,45b	38,04±6,90a	55,55±10,07b
Proteínas totais mg/100mg tecido	18,64±1,94a	17,51±1,79a	17,75±2,61a	18,14±2,92a

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p<0.05$). G1= controle; G2= RSV; G3= diabéticos; G4= diabéticos + RSV.

FIGURA 13. Valores médios obtidos para concentração tecidual de glicogênio (mg/g tecido).

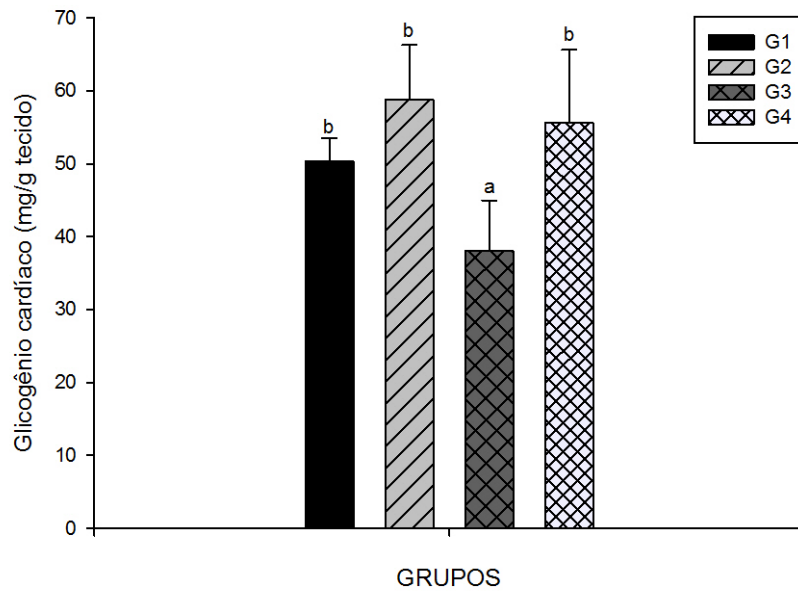
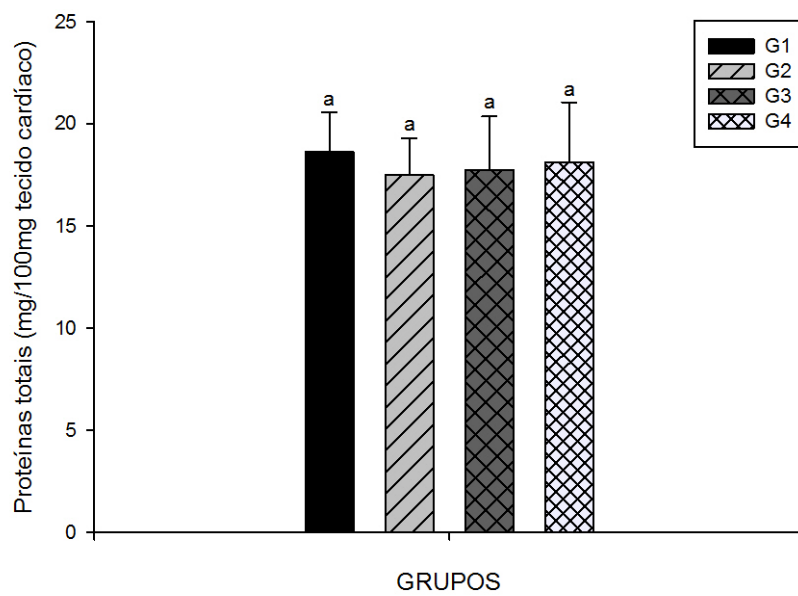


FIGURA 14. Valores médios obtidos para concentração tecidual de proteínas totais (mg/100mg tecido).



Na Tabela 6 estão apresentados os valores obtidos para a avaliação do estresse oxidativo no tecido cardíaco dos animais. A concentração cardíaca de glutathiona reduzida esteve diminuída nos animais diabéticos não tratados (G3). Ao passo que o tratamento com RSV elevou este parâmetro tanto em G2 como em G4. Nota-se que a concentração de glutathiona reduzida em G2 foi significativamente maior em comparação a G1, enquanto G4 não diferiu de G1. Analisando a concentração de glutathiona total, verifica-se que não houve diferenças significantes entre os grupos experimentais (Tabela 6; Figura 15).

Nota-se que os animais com diabetes induzido demonstraram elevação na concentração de hidroperóxido de lipídio, em comparação a G4, o qual não diferiu de G1 e G2 (Figura 16). A atividade da SOD foi menor no grupo G3 e maior em G1. Enquanto os grupos normal e diabético ao receberem RSV mostraram aumento ($p < 0.05$) na atividade desta enzima (Figura 17).

Conforme a Figura 18 pode-se verificar que RSV foi eficiente em elevar a atividade da glutathiona peroxidase no tecido cardíaco de animais diabéticos (G4), o qual não diferiu do grupo controle (G1).

TABELA 6. Resultados médios obtidos para a concentração cardíaca de, hidroperóxido de lipídio (HP), superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona total (GSH total) para os diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
GSH <i>nmol/mg proteína</i>	6,27±0,68b	7,62±0,84c	3,65±0,58a	6,63±0,76bc
GSH total <i>nmol/mg protein</i>	14,15±2,23a	15,57±2,42a	12,98±2,40a	15,97±1,79a
HP <i>nmol/g tecido</i>	202,55±30,78ab	190,97±28,27ab	236,01±39,58b	189,15±34,65a
SOD <i>nmol/mg proteína</i>	13,81±1,09c	12,22±1,05b	7,48±0,96a	12,20±0,80b
GSH-Px <i>nmol/mg tecido</i>	20,31±1,79b	20,98±1,24b	13,92±1,19a	20,69±1,16b

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos (p<0.05). G1= controle; G2= RSV; G3= diabéticos; G4= diabéticos + RSV.

FIGURA 15. Valores médios obtidos para concentração tecidual de GSH e GSH total (nmol/mg proteína).

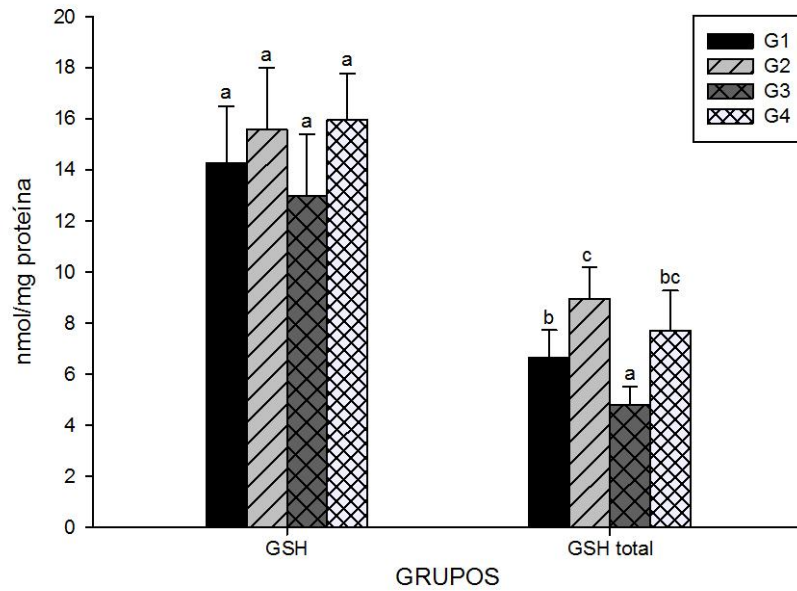


FIGURA 16. Valores médios obtidos para concentração tecidual de HP (nmol/g tecido).

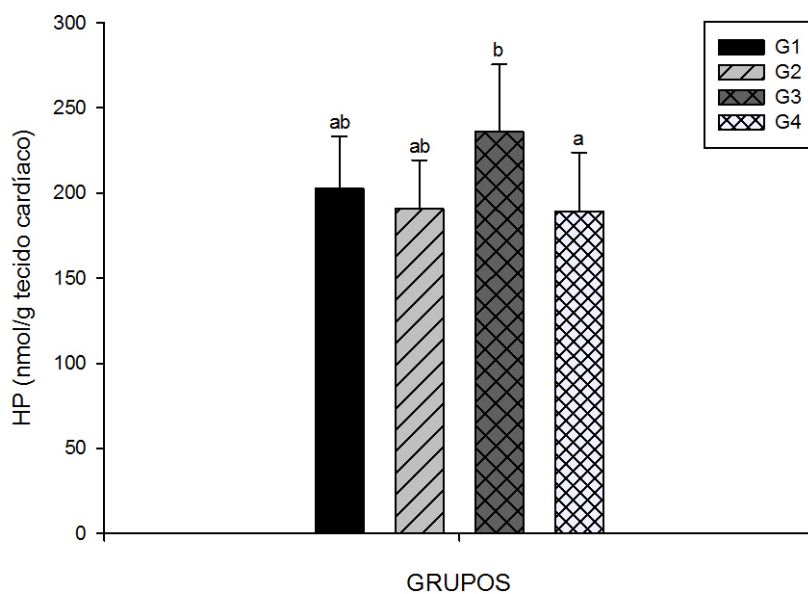


FIGURA 17. Valores médios obtidos para concentração tecidual de SOD (nmol/mg proteína).

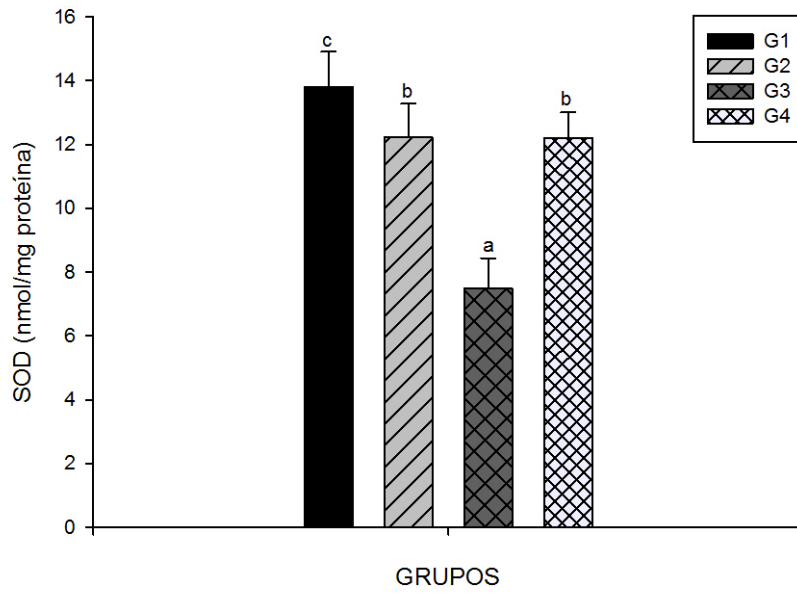
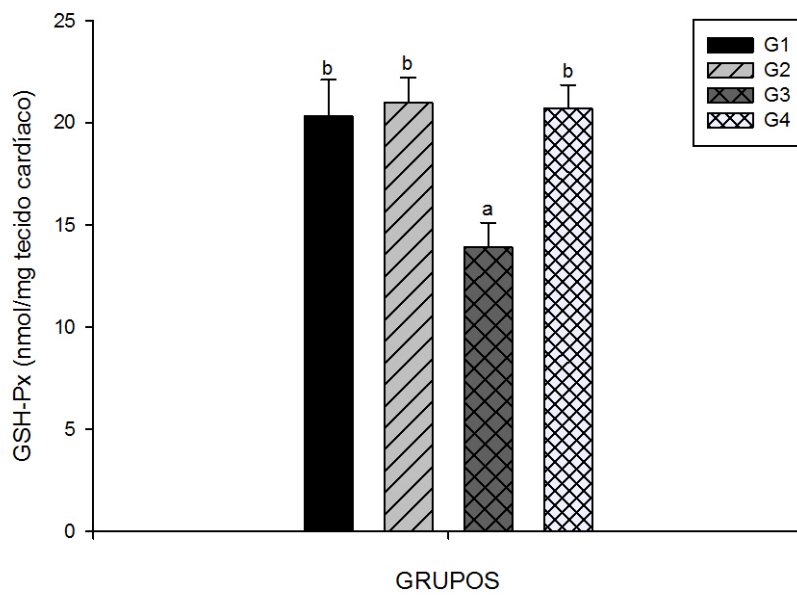
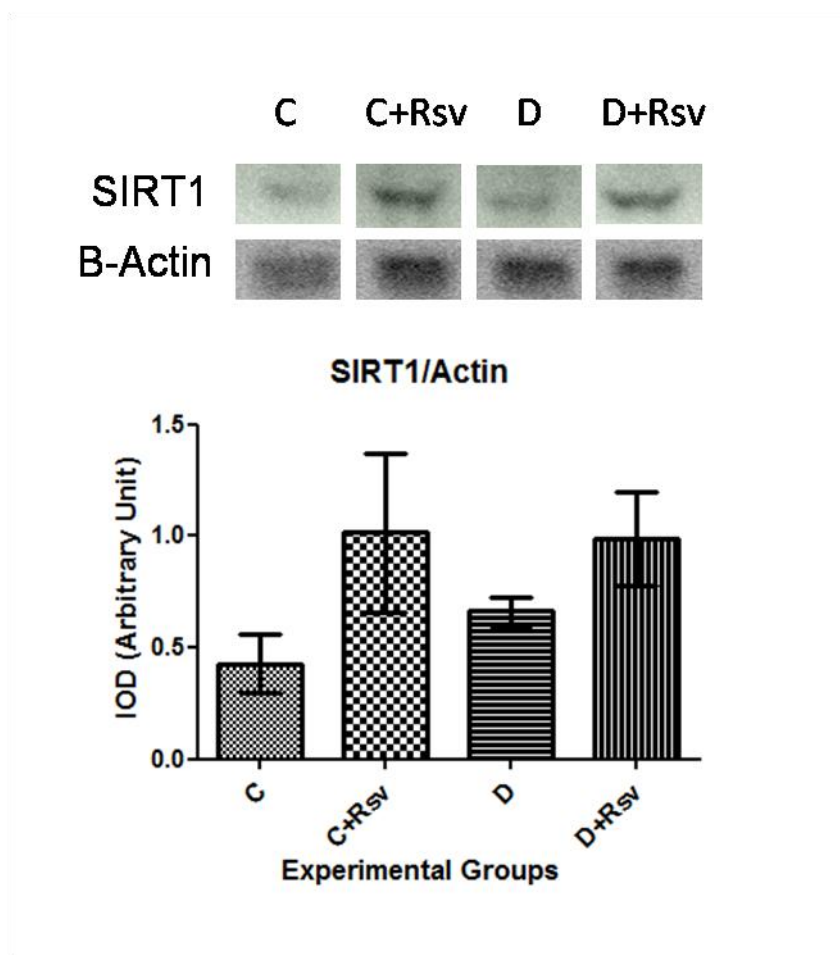


FIGURA 18. Valores médios obtidos para concentração tecidual de GSH-Px (nmol/mg tecido).



A análise de *western blotting* permite verificar que a concentração da SIRT1 no músculo cardíaco apresentou tendência em elevar-se nos animais, normais e diabéticos (G2 e G4), que receberam RSV, seguida daqueles diabéticos não tratados (G3 – Figura 19).

FIGURA 19. Valores médios obtidos para concentração tecidual de SIRT1/Actina (IOD–unidade-arbitrária).



Discussão

Resveratrol (3,5,4-trihidroxistibene), pertencente a classe dos polifenóis, é descrito na literatura devido a seus inúmeros efeitos farmacológicos (SOLEAS et al., 2001; DAS; DAS, 2010; DALAKLIOGLU et al., 2013).

No presente estudo, animais submetidos somente a administração de estreptozocina (G3) desencadearam um quadro de diabetes insulino dependente (tipo 1), ou seja, polifagia, polidipsia, redução de peso corporal e hiperglicemia.

A administração de STZ consiste num modelo experimental eficiente para induzir DM1, possibilitando o estudo de mecanismos fisiopatológicos e a atividade antiabetogênica de certas substâncias. Lenzen (2008) e Kirsten et al., (2010) relataram o efeito diabetogênico da STZ, a qual destrói seletivamente as células β -pancreáticas devido à similaridade da molécula de STZ com a da glicose, permitindo que a mesma seja internalizada via transportador GLUT2. Alguns mecanismos são propostos para explicar a citotoxicidade produzida pela STZ. A alcalinização do DNA celular e subsequente ativação da poli-ADP ribose sintetase causam depleção do NAD^+ nas células pancreáticas, redução na concentração de ATP, além de promover a formação de EROs, comprometendo a biossíntese e secreção de insulina (BOLZAN; BIANCHI, 2002).

O menor peso corporal nos animais de G3, mesmo com maior consumo alimentar e energia ingerida, pode ser explicado através das condições metabólicas especiais estabelecidas no quadro diabético. Devido a incapacidade das células oxidarem adequadamente a glicose, os ácidos graxos, provenientes da mobilização de triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo (lipólise) são preferencialmente utilizados como substrato oxidável. Além disso, ocorre degradação oxidativa de aminoácidos provenientes de proteínas estruturais, especialmente as musculares, com fornecimento de α -ceto-ácidos que podem ser tanto oxidados, para geração

energia, como direcionados para a gliconeogênese – processo inibido pela insulina (ORSOLIC et al., 2011). Estes processos metabólicos ativados no DM1 degradam as maiores reservas energéticas do organismo, promovendo redução no peso corporal.

No DM1 observa-se desequilíbrio na homeostase da glicose decorrente, principalmente pela ativação tanto da gliconeogênese como da glicogenólise hepática, processos bioquímicos inibidos pela insulina. Desta forma, o fígado passa a exportar moléculas de glicose para a corrente sanguínea (BARTH et al., 2007). Desde que a insulina estimula a captação de glicose pelos tecidos periféricos, a hiperglicemia é estabelecida e mantida em indivíduos diabéticos. Contudo, a alta ingestão alimentar, verificada nos animais diabéticos não tratados, também contribuiu para elevação da glicemia.

O aumento no consumo alimentar, em animais diabéticos (G3), pode ser atribuído à indisponibilidade de moléculas de glicose no meio intracelular, e também pela eliminação excessiva de glicose através da urina (glicosúria), uma vez que há hiperglicemia. Assim, na tentativa de diluir o filtrado glomerular ocorre diurese intensa, devido ao efeito osmótico da glicose nos túbulos renais, prevenindo a reabsorção tubular de líquidos e, portanto elevando o volume de água ingerido (DELVIN, 2007). Esta condição priva o organismo de considerável parte das calorias ingeridas através da dieta (ARDUINO, 1980).

A suplementação com resveratrol, em animais diabéticos, diminuiu tanto o consumo alimentar como de água, aumentou o peso corporal e controlou a glicemia (G4 – Tabela 1 e Figuras 4 e 5). Estes resultados são consistentes com Palsamy e Subramanian (2010) e Chen et al., (2011) ao relatarem os efeitos benéficos do resveratrol prevenindo a patogênese das complicações diabéticas, tais como, perda de peso corporal e ingestão alimentar excessiva, causada por distúrbios no

metabolismo da glicose e, opondo-se aos efeitos diabetogênicos causados pela STZ.

De acordo com Baur et al. (2006) e Lagouge et al. (2006) resveratrol melhorou os sintomas comuns observados no DM1, ou seja, reduziu a polifagia, o consumo de água e normalizou o peso corporal. Os autores também observaram maior captação e utilização da glicose como combustível metabólico pelos hepatócitos, adipócitos e células musculares. Desta forma, pode-se sugerir que os processos metabólicos – gliconeogênese e glicogenólise hepática – responsáveis de exportar glicose para a corrente sanguínea – foram atenuados e conseqüentemente houve maior controle glicêmico.

A literatura descreve os possíveis mecanismos de ação do resveratrol como substância antihiper-glicêmica.

Su et al. (2006) demonstraram que RSV exerce efeito anti-hiperglicemiante sem alterar os níveis de insulina plasmática em condições diabéticas, indicando que o resveratrol atua através de um mecanismo independente de insulina.

Por outro lado, Deng et al. (2008) relataram que o resveratrol pode promover a fosforilação do receptor de insulina (InsR), estimulando a translocação da GLUT4 para a membrana plasmática e conseqüentemente aumentando a captação da glicose.

O efeito hipoglicemiante esteve relacionado ao potencial antioxidante do resveratrol, o qual exerceu atividade protetora sobre as células β -pancreáticas contra o estresse oxidativo provocado pela STZ (PALSAMY; SUBRAMANIAN 2010; OZCELIK et al., 2011).

Contudo, estudos revelaram papel importante da via de sinalização do estradiol (E2), mediada por seu receptor (RE), na regulação do metabolismo da

glicose (GALLAGHER et al., 2007; COHEN, 2008). Desde que o RE é um modulador positivo da expressão da GLUT 4, a sua ausência em camundongos desencadeou resistência à insulina e, portanto, intolerância à glicose, indicando a sua importância na manutenção da homeostase da glicose (HEINE et al., 2000; CHAMBON, 2005). O efeito hipoglicêmico do resveratrol pode ser explicado pela similaridade da estrutura do resveratrol com a do estradiol, revelando alta afinidade por RE. Assim na presença de resveratrol, observou-se aumento da expressão da GLUT 4 (KUIPER et al., 1997; BARROS et al., 2006).

A homeostase da glicose em ratos diabéticos submetidos ao tratamento com resveratrol contribuiu para normalizar o peso corporal e controlar o consumo de água e alimentar.

Estudos epidemiológicos revelaram que a disfunção miocárdica é duas a cinco vezes mais freqüente em pacientes diabéticos, elevando os índices de mortalidade, comparados aos não-diabéticos (PATEL; GOYAL, 20011). Embora esta complicação seja de etiologia complexa, várias hipóteses, tais como, dislipidemias, alterações no metabolismo de carboidratos e lipídios e estresse oxidativo são extensivamente documentados na literatura como os principais fatores de risco para o desenvolvimento da cardiomiopatia diabética (WOLD et al., 2005; HAIDARA et al., 2006; KHULLAR et al., 2010; DENNIS et al., 2013).

Estudos demonstraram que a dislipidemia é considerada fator de risco importante na prevalência de eventos cardiovasculares relacionados principalmente à aterosclerose (ANDERSON et al., 1997). As consequências da doença vascular aterosclerótica constituem uma das principais causas de morbimortalidade a pacientes diabéticos (GOLBERT; CAMPOS, 2008).

Existe uma associação positiva entre perfil lipídico aterogênico e hiperglicemia, em condições diabéticas (HAIDARA et al., 2006; GLEISSNER et al., 2007; FERNANDES et al., 2010). Embora esta correlação esteja bem documentada na literatura, no presente estudo os animais com DM1 (G3) não demonstraram aumento no nível sérico de colesterol total, triacilgliceróis e VLDL-colesterol. Porém a concentração sérica de HDL-colesterol esteve reduzida nestes animais, em relação ao controle (G1 - Tabela 2 e Figura 6).

Animais diabéticos tratados com RSV apresentaram os menores valores para colesterol total, com significância em relação àqueles diabéticos não tratados (G3). Desde que há correlação direta entre hiperglicemia, glicação da lipoproteína LDL-colesterol e aumento de colesterol total (SANCHEZ-VERA et al., 2007; HAYER et al., 2007), no presente estudo a redução no nível sérico de colesterol total, pode ser devido ao maior controle glicêmico promovido pelo resveratrol.

Auger et al. (2002) relataram que polifenóis presentes no vinho tinto reduziram os níveis plasmáticos de colesterol.

Neste contexto, a alta glicemia promove a glicação das lipoproteínas LDL-colesterol, desta forma, as LDL-glicadas apresentam baixa especificidade com seu receptor de membrana, o que comprometeria o reconhecimento entre a célula e a fração lipoproteica e, conseqüentemente a internalização da LDL-colesterol (VALASTYAN et al., 2008). Considerando que as LDL-colesterol são as principais lipoproteínas responsáveis pelo transporte de colesterol através do plasma sanguíneo (VOET et al., 2008), o seu acúmulo, neste meio, reflete aumento na concentração de colesterol total. Desde que a hiperglicemia no DM esteja intimamente relacionada com dislipidemia, a redução na glicemia em animais de G4, pode de certa forma, ter impedido a glicação das LDL-colesterol e

conseqüentemente reduzido o nível de colesterol total. Assim, Johansen, et al., (2005) salientou a importância do controle glicêmico como fator benéfico contra a aterogênese diabética.

Estudos evidenciaram que a enzima hepática 27-hidroxilase, responsável pela degradação hepática do excesso de colesterol, aumentou na presença do resveratrol, diminuindo, portanto, a concentração intracelular de colesterol, condição básica para que ocorra a captação de LDL-colesterol pela célula (VOLOSHYNA et al., 2012).

Além disso, outros estudos mostraram o envolvimento do RSV durante a internalização celular das LDL-colesterol, através de uma cascata de sinalização molecular com a participação principalmente do PPAR γ (receptor proliferador ativado por peroxissomos) (TOBIN et al. 2000).

Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar as propriedades anti-aterogênicas do resveratrol, incluindo a inibição da lipoperoxidação e, portanto a manutenção estrutural intacta da LDL-colesterol (FREMONT et al., 1999), modulação da agregação plaquetária (WANG et al., 2002) e redução da inflamação mediada por macrófagos (TSAI et al., 1999)

Nota-se que a administração apenas de RSV (G2) aumentou os níveis séricos tanto de triacilgliceróis como de VLDL-colesterol, comparativamente àqueles obtidos para os animais controle (G1).

No DM tipo1 a lipólise no tecido adiposo está estimulada, resultando em liberação de ácidos graxos livres que são transportados para o fígado, onde são oxidados e/ou reesterificados em triacilgliceróis, os quais são incorporados em VLDL-colesterol e exportados para a corrente sanguínea (GODBERG et al., 2008).

Conforme Valastyan et al. (2008) a concentração de triacilgliceróis e de VLDL-colesterol na corrente sanguínea depende basicamente de dois processos metabólicos, ou seja, a biossíntese hepática de triacilgliceróis e da remoção plasmática das lipoproteínas VLDL-colesterol e quilomícrons, que consiste no catabolismo extra-celular destas lipoproteínas tanto no tecido adiposo como no músculo.

Embora estes eventos metabólicos sejam observados em condições diabéticas, no presente estudo, não houve aumento significativo na concentração sérica de triacilgliceróis e de VLDL-colesterol em animais diabéticos, resultados opostos foram obtidos por Gleissner et al. (2007) ao demonstrarem aumento nestes lipídios no DM1, a medida que a atividade da lipase lipoproteica diminuía.

Além disso, a suplementação de RSV em animais diabéticos (G4) apresentou tendência em reduzir, porém de forma não significativa, estes parâmetros. No entanto verifica-se redução significativa de triacilgliceróis, quando RSV é administrado em condições diabéticas (G4), em comparação a G2.

Esta tendência em reduzir, principalmente os níveis de triacilgliceróis, pode ser explicada pelo maior controle glicêmico promovido pelo RSV, o que pode ter refletido em menor lipólise e, conseqüentemente menor síntese *de novo* de triacilgliceróis, a partir de ácidos graxos excedentes no tecido hepático, conforme relatado por Cardoso et al. (2011).

Quanto a concentração de HDL-colesterol, verifica-se que animais diabéticos não tratados com RSV (G3) apresentaram menores valores para esta fração lipoproteica (Tabela 2 e Figura 6). Estes resultados são respaldados na literatura ao relatar a correlação direta entre decréscimo na taxa de HDL-colesterol e aumento no fator de risco para acidentes cardiovasculares em pacientes diabéticos, pois a falta

desta lipoproteína no plasma sanguíneo compromete o transporte invertido do colesterol, ou seja, o deslocamento do excesso de colesterol dos tecidos extra-hepáticos para o fígado (REBOLLEDO; DATO, 2005; COSTACOU et al., 2008).

A suplementação de RSV, em animais diabéticos (G4) foi eficiente em aumentar a concentração de HDL-colesterol, indicando seu efeito anti-aterogênico.

Os níveis plasmáticos de creatinina e de uréia refletem a taxa de filtração renal, de forma que a elevação destes compostos nitrogenados indica deficiência renal. Assim a dosagem de creatinina e de uréia no sangue torna-se importante para avaliação da função renal, pois a concentração está aumentada à medida que a velocidade da filtração glomerular diminui (GONZÁLEZ, 2009; LIMA, 2009). No presente estudo a deficiência renal foi evidenciada através da análise sérica de uréia e de creatinina.

Estudos clínicos demonstraram que a hiperglicemia é um importante fator para o desenvolvimento e progressão de doenças renais em pacientes diabéticos (HAIDARA et al., 2009).

No DM1 ocorre alterações no metabolismo de carboidratos, os quais não são adequadamente utilizados como substrato energético. Neste caso proteínas teciduais são catabolisadas e a cadeia carbônica dos aminoácidos é empregada como combustível metabólico e o grupamento α -amino, na forma de íon amônio (NH^+4), é convertido em uréia no fígado (EL-DEMERDASH et al., 2005; VOET et al., 2008). Embora não tenha sido observado alterações na concentração de proteínas séricas e cardíacas entre os grupos experimentais, nota-se aumento no nível sérico de uréia nos animais diabéticos (Tabelas 3 e 5 e Figuras 7, 8 e 14). Este aumento pode indicar algum grau de comprometimento tanto hepático como renal, desde que a uréia é formada exclusivamente no fígado e excretada pela urina.

A creatinina é um composto nitrogenado, formado a partir da desfosforilação da fosfocreatina. O músculo esquelético é o principal depósito de fosfocreatina e, portanto, torna-se relevante na produção de creatinina, a qual é lançada na circulação sanguínea e excretada através da urina (HEYMSFIELD et al., 2005). Como a produção de creatinina é relativamente constante, aumentos na concentração plasmática desse composto indicam diminuição da excreção renal.

Estes resultados estão de acordo com Saeed et al. (2008) ao relatarem que a disfunção renal, em condições diabéticas, pode contribuir para a elevação tanto de uréia como de creatinina.

Adicionalmente, as alterações renais podem ser acompanhadas com as dislipidemias. Embora o controle da glicemia seja o principal fator na prevenção da nefropatia diabética, a elevação no colesterol total sérico pode estar associada à função renal (MULEC et al., 1990). O controle da hipercolesterolemia tem sido eficaz na redução da nefropatia diabética (MATHUR et al., 2002).

Vários mecanismos podem explicar a relação entre disfunção renal, acompanhada por proteinúria e dislipidemia. Viziri et al, (2001) verificaram que a hipoalbumemia estimula a atividade da hidroximetil glutari-CoA redutase, conseqüentemente maior síntese de colesterol e hipercolesterolemia. A baixa concentração de HDL-colesterol também esteve associada a proteinúria elevada, uma vez que as anormalidades renais reduzem a atividade da lecitina-colesterol acil transferase, enzima aderida à superfície desta lipoproteína (VIZIRI et al., 2003). Desta forma, pode-se explicar a diminuição tanto de uréia como de creatina em animais diabéticos tratados com RSV, uma vez que o composto foi eficiente em reduzir o nível sérico de colesterol e controlar a glicemia, indicando o efeito benéfico do RSV sobre a toxicidade renal.

A LDH é uma enzima com alta atividade no tecido cardíaco que catalisa a conversão reversível do piruvato a lactato, sendo de fundamental importância no metabolismo glicídico, em processos envolvendo a glicólise anaeróbica. Sua elevada atividade sérica torna-se importante no diagnóstico de lesões celulares que provocam seu extravasamento para a corrente sanguínea, principalmente do tecido cardíaco (BURTIS et al., 2008).

A elevada atividade sérica da LDH observada em animais diabéticos não tratados (G3-Tabela 3 e Figura 10) comprovam que o diabetes induzido pela estreptozotocina pode ter provocado algum grau de toxicidade cardíaca, pois segundo El-Demerdash et al. (2005) e Kumar et al. (2006) estas lesões provocam a liberação do conteúdo enzimático para meio extracelular. Os resultados obtidos, no presente estudo, são concordantes com Sekar et al. (2005) que observaram aumento na atividade da LDH no plasma sanguíneo de ratos diabéticos com isquemia cardíaca.

A atividade da LDH no soro foi reduzida com a administração do RSV em ratos diabéticos, indicando a sua eficiência em atenuar os efeitos tóxicos provocados pela estreptozotocina e, portanto, seu potencial cardioprotetor. Estes resultados são respaldados por Patel e Goyal (2011) ao descreverem que o RSV diminuiu a atividade da LDH em condições diabéticas e menor disfunção cardíaca.

A LDH exerce papel indispensável para reoxidar o NADH, em condições anaeróbicas, sempre que a razão NAD^+/NADH estiver baixa e, isto é possível durante a interconversão do piruvato a lactato (KAVANAGH et al., 2004).

Estudos revelaram que a atividade cardíaca da LDH aumenta no diabetes mellitus tipo 1, o que pode indicar comprometimento no metabolismo aeróbico, tais como β -oxidação, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa (PUNITHA et al., 2005; FERNANDES et al., 2010).

Contudo, nota-se que a LDH não teve sua atividade alterada no tecido cardíaco, sugerindo que os processos bioquímicos oxidativos mitocondriais foram preservados, mesmo com alta atividade sérica no grupo dos animais diabéticos (G4- Tabela 4 e Figura 11).

A normalização da atividade da LDH nos tecidos é importante para garantir proporções adequadas de piruvato e NADH, fornecidos através da glicólise e, que sejam posteriormente oxidados a acetil-CoA e fosforilação oxidativa, respectivamente (PALSAMY; SUBRAMANIAN, 2008).

A continuidade das vias metabólicas na mitocôndria das células cardíacas, em ratos diabéticos (G3), pode ser verificada através da elevada atividade tanto da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase e como da citrato sintase, enzimas biomarcadoras das vias β -oxidação e ciclo do ácido cítrico, respectivamente.

A elevação na atividade destas enzimas nos animais diabéticos pode ser decorrente da alta lipólise, proporcionando maior fluxo de ácidos graxos para o tecido cardíaco, onde são β -oxidados a acetil-CoA, a qual é oxidada no ciclo do ácido cítrico.

De fato, alta taxa da β -oxidação foi observada no DM1, elevando a produção de acetil-CoA, a qual causa *feedback* negativo sobre a atividade da piruvato desidrogenase que representa o ponto de entrada do piruvato para ser oxidado aerobicamente e, isto acarreta baixa oxidação da glicose (LOPASCHUK et al., 2010).

Estudos revelaram que o aumento na utilização e oxidação de ácidos graxos em detrimento a oxidação da glicose no miocárdio exerce papel fundamental para o desenvolvimento da cardiomiopatia diabética que está associada as anormalidades no metabolismo de lipídios, onde a taxa de captação e oxidação de ácidos graxos

livres pelas células cardíacas é diretamente proporcional a severidade da patogênese (ROLO; PALMEIRA, 2006; VASSORT; TURAN, 2010; PATEL; GOYAL, 2011).

A elevada oxidação de ácidos graxos libera grande quantidade de equivalentes redutores (NADH e FADH), os quais se reoxidam liberando elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, aumentando assim o fluxo de elétrons, o que pode ocasionar a estagnação e saída de elétrons da membrana mitocondrial interna. Nestas condições, pode ocorrer redução parcial do oxigênio molecular e formar as espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente o ânion superóxido (OTANI, 2002). Westbrook et al. (2009) relataram que o aumento da atividade na membrana mitocondrial eleva a geração das EROs.

Neste contexto, a modulação do combustível metabólico no miocárdio, no sentido de diminuir a oxidação de ácidos graxos e aumentar a oxidação de glicose como substrato oxidável, torna-se relevante com a utilização de agentes farmacológicos com ação hipoglicemiante e antioxidante.

A melhora no metabolismo energético cardíaco em condições diabéticas pode ser um método para prevenir ou atenuar a disfunção cardíaca (LOPASCHUCK et al., 2007).

A oxidação de ácidos graxos para obtenção de energia requer elevada concentração de oxigênio, podendo constituir fonte endógena para geração de radicais livres, deste modo, a elevação na oxidação da glicose miocárdica que requer proporcionalmente menor quantidade de oxigênio, pode apresentar efeitos benéficos, permitindo adequada obtenção de energia em condições de baixa tensão de oxigênio, constituindo importante alvo da terapia metabólica. Sendo assim, componentes da dieta ou a suplementação de compostos capazes de modular o

metabolismo energético podem apresentar importante papel terapêutico (LOPASCHUCK et al., 2007).

No presente estudo, a administração de RSV em animais diabéticos, foi eficiente em reduzir a atividade da β -hidroxiacil-transferase e da citrato sintase, sugerindo que RSV promoveu maior captação e utilização da glicose e normalizou o metabolismo de lipídio, provavelmente por controlar a lipólise. Estes resultados estão de acordo com Rocha et al. (2009) ao relatarem que o RSV aumentou a utilização de glicose no tecido hepático.

O glicogênio, um polímero ramificado de resíduos de glicose, sintetizado pela enzima glicogênio sintase, é a forma armazenável da glicose e sua quantidade em vários tecidos é uma manifestação direta da insulina, por estimular a atividade da glicogênio sintase e inibir a glicogênio fosforilase (PEDERSON et al., 2005).

No modelo de indução do DM1 utilizado, através da administração de STZ, ocorre diminuição dos níveis de insulina, e isso é responsável por diminuir os níveis de glicogênio nos tecidos que o estocam (BISHOP, 1970; WHITTON; HEMS, 1975; GOLDEN et al., 1979).

A administração de RSV em animais diabéticos (G4) regulou o estoque de glicogênio no músculo cardíaco.

Vários estudos têm demonstrado que o diabetes mellitus está associado ao estresse oxidativo, através da produção excessiva de ERO e/ou redução do sistema endógeno antioxidante (BROWNLEE, 2005; COSKUN et al., 2005; VICENTINI et al., 2011).

Espécies reativas de oxigênio, tais como ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxil ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são continuamente produzidos em vários tipos celulares sob condições fisiológicas. O nível das EROs é regulado por

sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (VASSORT; TURAN, 2010). O desequilíbrio entre a produção e a neutralização das EROs leva ao estado de estresse oxidativo, o qual torna-se determinante nas complicações cardiovasculares associadas ao DM.

Há grande número de métodos laboratoriais para determinar o estado oxidante/antioxidante. Entre os propostos como biomarcadores do estresse oxidativo estão a determinação da concentração de HP, a quantificação de compostos antioxidantes, marcadores da oxidação protéica e do ácido desoxirribonucléico e a atividade das enzimas antioxidantes (NOVELLI, 2005).

A glutathiona reduzida, importante substrato da glutathiona peroxidase, esteve diminuída no tecido cardíaco dos animais diabéticos (G3 – Tabela 6 e Figura 15). Palsamy e Subramanian (2010) relataram que o declínio no sistema de defesa antioxidante não-enzimático expõe os miócitos à susceptibilidade ao estresse oxidativo. Parveen et al. (2013) observaram baixo nível de glutathiona reduzida no fígado e pâncreas em condições diabéticas. Há evidências que o controle inadequado da glicemia está associado ao estresse oxidativo. Estudos *in vitro*, sob condições de elevada concentração de glicose, revelaram decréscimo na concentração da glutathiona reduzida (MARCO et al., 2009). A quantidade de glutathiona reduzida no tecido aórtico apresentou correlação negativa com o nível de glicose sanguínea, sugerindo desequilíbrio no *status redox* celular (TACHI et al., 2001). Likidilid et al. (2007) relataram maior taxa de consumo da glutathiona reduzida nos eritrócitos, devido a diminuição da via pentose fosfato que regenera o NADPH, o qual participa como equivalente redutor durante a redução da glutathiona oxidada.

No presente estudo, nota-se que concentração cardíaca de glutathiona reduzida aumentou nos animais diabéticos tratados com resveratrol (G4 Tabela 6 e

Figura 15). Desde que a hiperglicemia crônica é persistente e frequentemente associada com o declínio acentuado na concentração intracelular de substâncias antioxidantes, a melhora no nível de glutathiona reduzida, pode ser atribuído ao melhor controle glicêmico promovido pelo resveratrol.

Outro possível mecanismo seria a atuação do RSV sobre a atividade da glutathiona redutase, enzima responsável pela redução da glutathiona a partir da sua forma oxidada (GSSG). Dalaklioglu et al. (2013) relataram que o RSV manteve a concentração da glutathiona reduzida (GSH) por aumentar a atividade hepática da glutathiona redutase.

A proteção da célula contra estresse oxidativo foi verificada com aumento na razão GSH/GSSG, mantendo desta forma, a homeostase do estado redox através do sistema glutathiona na presença de RSV (CHEN et al., 2011).

A elevada concentração de hidroperóxido de hidrogênio, subproduto da peroxidação dos ácidos graxos insaturados dos fosfolípidios das membranas biológicas, esteve relacionada a maior depleção da glutathiona reduzida em adipócitos isolados (BISWAS et al., 2005; IVANOV et al., 2011).

Houve tendência em aumentar a concentração de HP no miocárdio dos animais diabéticos (G3 – Tabela 6 e Figura.16). O estresse oxidativo e lipoperoxidação com elevação no HP pode afetar a função miocárdica de maneira similar ao dano induzido pela isquemia e subsequente reperfusão, incluindo perda celular de K^+ , depleção de ATP e diminuição da função metabólica (MALLET et al., 2005).

Estes resultados são consistentes com Likidlilid et al. (2007) ao relatarem que pacientes diabéticos suscetíveis ao estresse oxidativo apresentaram associação entre hiperglicemia e peroxidação mediada pelas EROs. Patel e Goyal (2011)

evidenciaram que o aumento na geração de EROs pode provocar remodelação cardíaca por dano celular, o qual contribui com alterações morfológicas e funcionais que estiveram associadas a cardiomiopatia diabética. Os autores salientaram o benefício em reduzir a peroxidação lipídica no sentido de amenizar as complicações cardiovasculares em pacientes com DM1.

A suplementação de RSV em animais diabéticos resultou em menor produção de HP (Tabela 6 e Figura 16). Estes resultados são respaldados na literatura. Dalaklioglu et al. (2013) demonstraram que o RSV diminuiu a lipoperoxidação hepática e, portanto, a produção de hidroperóxido de lipídio. Vários estudos têm descrito a habilidade do resveratrol em quelar o ânion superóxido e o radical hidroxila, os quais podem iniciar o processo da lipoperoxidação. Palsamy e Subramanian (2010) também observaram queda neste processo, na presença de resveratrol.

O estresse oxidativo no diabetes, com aumento mitocondrial de EROs, está associado a vários mecanismos envolvendo a hiperglicemia como fator principal, que resulta na estimulação da via poliol, produção intracelular de precursores dos produtos de glicação avançada (AGE), ativação da proteína quinase C (PKC) e ativação da via da hexosamina (LAPOLLA et al., 2005; ROLO; PALMEIRA, 2006; SILVA et al., 2011).

A superóxido dismutase pertence a série de enzima com ação antioxidante, responsável por catalisar a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. Desde que a cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte intracelular de ânion superóxido (O_2^-) a atividade da SOD é de grande importância na regulação dos níveis de O_2^- mitocondrial (CHEN et al., 2011).

Animais diabéticos não tratados (G3 – Tabela 6 e Figuras 17 e 18) apresentaram os menores valores para atividade tanto da SOD como da GSH-Px. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Sindhu et al., (2004) e Aksoy et al., (2005) ao observarem depleção no mecanismo endógeno das defesas antioxidantes no diabetes, com alterações na atividade das enzimas antioxidantes. Majithiya e Balaraman (2005) associaram o decréscimo do sistema antioxidante à hiperglicemia, devido a glicação das enzimas antioxidantes, em especial a SOD, podendo alterar a estrutura e a catálise enzimática, exacerbando, deste modo, o estresse oxidativo.

Segundo Sarkhail et al. (2007) a atividade das enzimas antioxidantes, GSH-Px e SOD, tem mostrado importante papel na manutenção dos níveis fisiológicos de peróxido de hidrogênio, decorrente da dismutação do radical superóxido, gerados durante a exposição à estreptozotocina.

Desde que a atividade da GSH-Px depende de níveis adequados de glutathiona reduzida, a qual requer NADPH_2 como equivalente redutor, a baixa atividade da enzima pode ser explicada pela falta de NADPH_2 que é reduzido pela via pentose fosfato. Além disso, essa coenzima é utilizada pela via do poliol que está ativada em condições hiperglicêmicas, contribuindo para diminuir a disponibilidade celular de NADPH_2 e, conseqüentemente a atividade da GSH-Px (BROWNLEE, 2005).

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o resveratrol aumentou a atividade das enzimas antioxidantes no tecido cardíaco de ratos com diabetes, em comparação aqueles não tratados (Tabela 6 e Figuras 17 e 18).

O efeito cardioprotetor, mediada pelo RSV, tem sido atribuída ao controle do estresse oxidativo, em estudos realizados *in vivo* e *in vitro* (MOVAHED et al., 2012).

Os autores explicaram que a diminuição do estresse oxidativo pode ser atribuída a preservação da atividade das enzimas antioxidantes pelo RSV.

Estudos revelaram que os efeitos do RSV têm sido atribuídos a habilidade de induzir a atividade da proteína SIRT1 (*Silent information regulator*) (HOWITZ et al., 2003; WOOD et al., 2004; BORDONE; GUARENTE, et al., 2005; RODGERS; PUIGSERVER, 2007; SUN et al., 2007).

SIRT1, proteína pertencente a Classe das histonas deacetilases, enzimas redox sensíveis e dependentes de NAD celular como cofator para a deacetilação (IMAI et al., 2000; LANDRY et al., 2000). Esta proteína regula uma ampla variedade de processos celulares como apoptose e sobrevivência celular, sinalização endócrina, transcrição gênica, dentre outros. Mais especificamente, sugere-se que SIRT1 apresenta papel na regulação da homeostase glicêmica (LAGOUGE et al., 2006; MILNE et al., 2007) e pode estar envolvida na cascata de sinalização da insulina (ZHANG et al., 2007).

Através da Figura 19 pode-se notar que a expressão cardíaca da SIRT1 esteve elevada em animais diabéticos não tratados, comparativamente ao controle (G1). Nesse sentido, Sulaiman et al., (2010) relataram que animais diabéticos apresentaram alta expressão da SIRT1, demonstrando uma resposta adaptativa do coração.

Porém, animais, normais ou diabéticos, que receberam RSV apresentaram os maiores valores, sugerindo a sua ação ativadora sobre esta proteína. Estes resultados podem explicar o efeito benéfico do RSV.

Alcendor et al., (2007) relataram que a expressão da SIRT 1 esteve associada ao efeito protetor da célula contra danos oxidativos, enquanto a sua inibição promove morte celular.

Além disso, SIRT1 apresenta efeitos associados com a proteção contra o desenvolvimento da aterosclerose. SIRT1 inibe o receptor para LDL oxidada em células endoteliais e macrófagos, impedindo desta forma, a probabilidade de formar placa de ateroma. (STEIN et al., 2010).

Conclusão

Diante dos resultados obtidos concluiu-se que o Diabetes mellitus tipo 1 aumentou o consumo alimentar e de água, reduziu o peso corporal, promoveu hiperglicemia, além de induzir alterações metabólicas, com oxidação excessiva de lipídios e, estresse oxidativo no tecido cardíaco. A administração de resveratrol normalizou os efeitos prejudiciais observados na condição diabética, controlando a perda de peso corporal, a hiperglicemia, a ingestão de ração e água, atenuando a oxidação de lipídios e o estresse oxidativo, além de aumentar a concentração da SIRT1 no miocárdio de ratos diabéticos. Os efeitos benéficos observados pela administração de resveratrol estiveram associadas à sua atividade hipoglicemiante e antioxidante.

Referências Bibliográficas

AHLENSTIEL, T.; et al. Bioflavonoids attenuate renal proximal tubular cell injury during cold preservation in Euro-Collins and University of Wisconsin solutions. **Kidney Int.**, v.63, p.554-563, 2003.

AKSOY, N.; et al. Beneficial effects of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats. **Nutr. Res.**, v.25, n.6, p.625-630, 2005.

ALCENDOR, R.R.; et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. **Circ Res**, v.100, p.1512–1521, 2007.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.33, 2010.

ANDERSON, K.A.; CASTELLI, W.P.; LEVY, D. Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham Study. **JAMA**, v.527, p.2176-2180, 1997.

ARDUINO, F. **Sintomas, diagnóstico, prognóstico e mortalidade da diabetes. Diabetes Mellitus.** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980. p.78-94.

AUGER, C.; e t al. Red wine phenolic compounds reduce plasma lipids and apolipoprotein B and prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). **J Nutr.**, v.132, p.1207–1213, 2002.

BARROS, R.P.; et al. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, p.1605–1608, 2006.

BARTH, E.; et al. Glucose metabolism and catecholamines. **Critical Care Medicine**, v. 35, p. 508-518, 2007.

BASS, A.; et al. Metabolic differentiation of distinct muscle at the the level of enzymatic organization. **Eur J Biochem.**, v.10, p.198-206, 1969.

BAUR, J.A.; et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v.444, p.337–342, 2006

BAUR, J.A.; SINCLAIR, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v.5, p.493–506, 2006.

BAYNES, J. W.; THORPE, S.R. Perspectives in Diabetes: The role of oxidative stress in diabetic complications. A New Perspective on an Old Paradigm. **Diabetes**, v.48, p.277-284, 1999.

BISHOP, J.S. Inability of insulin to activate liver glycogen transferase D phosphatase in the diabetic pancreatectomized dog. **Biochim. Biophys. Acta**, v.208, p.208–218, 1970.

BISWAS, S.K.; et al. Depressed glutathione synthasis preceds oxidative stress and atherogenesis in Apo-E(-/-) mice. **Biochem Biophys Res Comm.**, v.338, p.1368-1373, 2005.

BOLZAN, A.D.; BIANCHI, M.S. Genotoxicity of streptozotocin. **Mutat. Res.**, v.512, n.2, p.121-134, 2002.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D. The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. **Treatments in Endocrinology**, v.3, n.1, p.41-52, 2004.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; et al. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. **Diabetes & Metabolism**, v.26, p.163-176, 2000.

BORDONE, L.; GUARENTE, L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v.6, p.298–305, 2005.

BOUCHÉ, C.; et al. The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes, **Endocr. Rev.**, v.25, p.807–830, 2004.

BOUDINA, S.; ABEL, E.D. Diabetic cardiomyopathy revisited. **Circulation**, v.115, n.3, p.3213-3223, 2007.

BRADAMANTE, S.; et al. Resveratrol provides late-phase cardioprotection by means of a nitric oxide- and adenosine-mediated mechanism. **European Journal of Pharmacology**, v.465, p.115–123, 2003.

BRAY, T.M. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. **Nutrition**, v.16, n.7-8, p.578-581, 2000.

BROWN, A. A; HU, F. B. Dietary modulation on endothelial function: implications for cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr.**, v.71, p.673-686, 2001.

BROWNIE, M. The pathobiology of diabetic complications – a unifying mechanism. **Diabetes**, v.54, p.1615-1625, 2005.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v.414, p.813–820, 2001.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. Tiez: **Fundamentos de Química Clínica**. 6ª. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

CARDOSO, L.M.; et al. Efeito das tinturas de café torrado e moído nos níveis séricos de colesterol, triglicerídeos e glicose em ratos diabéticos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.32, n.1, p.77-81, 2011.

CERIELLO, A.; MOTZ, E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.24, p.816-823, 2004.

CERIELLO, A.; TESTA, R. Antioxidant anti-inflammatory treatment in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.32, p.S232-236, 2009.

CHAMBON, P. The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. **Molecular Endocrinology**, v.19, p.1418-1428, 2005.

CHEN, K.H.; et al. Resveratrol ameliorates metabolic disorders and muscle wasting in streptozotocin-induced diabetic rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.301, p.E853–E863, 2011.

COHEN, P.G. Obesity in men: the hypogonadal-estrogen receptor relationship and its effect on glucose homeostasis. **Med Hypotheses**, v.70, p.358 –360, 2008.

COHN, R. M.; ROTH, K. S. Lipid and lipoprotein metabolism. **Biochemistry and disease**. Baltimore: Williams and Wilkins Publishers, p.280, 1996.

COSKUN, O.; et al. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. **Pharmacol. Res.**, v.51, n.2, p.117-123, 2005.

COSTACOU, T.; et al. Plasma and dietary vitamin E in relation to insulin secretion and sensitivity. **Diabetes, Obesity & Metabolism**, v.10, p.223-228, 2008.

CROUCH, R. K.; GANDY, S. C.; KISEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v.30, p.235-241, 1981.

DALAKLIOGLU, S.; et al. Resveratrol ameliorates methoptrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. **Human & Experimental Toxicology**, v.32, p.662-671, 2013.

DAS, M.; DAS, D.K. Resveratrol and cardiovascular health. **Molecular Aspects of Medicine**, v.31, p.503-512, 2010.

DENG, J.Y.; et al. Activation of estrogen receptor is crucial for resveratrol-stimulating muscular glucose uptake via both insulin-dependent and -independent pathways. **Diabete**, v.57, p.1814–1823, 2008.

DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 6.ed. São Paulo: Blücher, 2007.

DENNIS, K.; et al. Augmented cardiac formation of oxidatively-induced carbonylated proteins accompanies the increased functional severity of post-myocardial infarction heart failure in the setting of type 1 diabetes mellitus. **Cardiovascular Pathology**, v.43, p.380-386, 2013.

DU, X.L.; et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.97, p.12222-12226, 2000.

EBAID, G. M.; et al. Effects of digitonin on hyperglycemia and dyslipidemia induced by high-sucrose intake. **Food Chem Toxicol.**, v.44, p.293-299, 2006.

EL-DEMERDASH, F.M.; YOUSEF, M.I.; EL-NAGA, N.I. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. **Food Chem. Toxicol.**, v.43, n.1, p.57-63, 2005.

EL-KABBANI, O.; et al. Aldose reductase structures: Implications for mechanism and inhibition. **Cel Mol Life Sci.**, v.61, n.7-8, p.750-762, 2004.

FERNANDES, A.A.H.; et al. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.64, p.214-219, 2010.

FISHER, B. M.; FRIER, M. Evidence for a specific heart disease of diabetes in humans. **Diabetic Med.**, v.7, p.478-489, 1990.

FORBES, J. M.; GOUGHLAN, M. T.; COOPER, M. E. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. **Diabetes**, v.57, p.1446-1454, 2008.

FREMONT, L., BELGUENDOZ, L., DELPAL, S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. **Life Sci**, v.64, p.2511-21, 1999.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, v.201, p.1203-1209, 1998.

GALLAGHER, C.J.; et al. Association of the estrogen receptor-gene with the metabolic syndrome and its component traits in African-American families: the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. **Diabetes**, v.56, p.2135–2141, 2007.

GLEISSNER, C.A.; GALKINA, J.L.; NADLER, J.L.; LEY, K. Mechanisms by which diabetes increases cardiovascular disease. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 4, p. 131-140, 2007.

GOLBERT, A.; CAMPOS, M.A.A. Diabetes Melito Tipo 1 e Gestação. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.52, p.307-314, 2008.

GOLDBERG, I.J.; et al. decreased lipoprotein clearance is responsible for increased cholesterol in LDL receptor knockout mice with streptozotocin-induced diabetes. **Diabetes**, v.57, p.1674-1682, 2008.

GOLDEN, S.; WALS, P.A.; OKAJIMA, F.; KATZ, J. Glycogen synthesis by hepatocytes from diabetic rats, **Biochem. J.** v.182, p.727–734, 1979.

GONZÁLEZ, F.H.D. Laboratório de análises clínicas veterinárias. Porto Alegre: UFRGS, 2009. Disponível em:
<http://www6.ufrgs.br/bioquimica/extensao/perfil/creatinina.htm>>. Acesso em: 29 maio 2009.

Haidara, M.A.; et al. Evaluation of the effect of oxidative stress and vitamin E supplementation on renal function in rats with streptozotocin-induced type 1 diabetes. **J. Diabet. Complications**, v.23, p.130-136, 2009.

Haidara, M.A.; et al. Role of oxidative stress in development cardiovascular complications in diabetes mellitus. **Current Vascular Pharmacology**, v.4, p.215-227, 2006.

Halliwel, B. Antioxidants in human health and disease. **Ann Rev Nutr.**, v.16, p.33-50, 1996.

Halliwel, B.; Cross, C. E.; Gutteridge, J. M. C. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? **J Lab Clin Med.**, v.119, p.598-620, 1992.

Halliwel, B.; Gutteridge, J. Free Radicals in Biology and Medicine (4th ed.). **Oxford University Press**: USA, 2007.

Hayer, T.; et al. Macrophage NADPH oxidase activation, impaired cholesterol fluxes, and increased cholesterol biosynthesis in diabetic mice: a stimulatory role for D-glucose. **Atherosclerosis**, v.195, p.277-286, 2007.

Heine, P.A.; et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-knockout mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, p.12729 –12734, 2000.

HEYMSFIELD, S.B.; et al. The end of body composition methodology research? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.8, p.591-594, 2005.

HOWITZ, K.T.; et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**, v.425, p.191–196, 2003.

IMAI, S.; et al. Transcriptional silencing and longevity protein sir2 is a NAD-dependent histone deacetylase. **Nature**, v.403, p.795–800, 2000.

IVANOV, V.V.; et al. Effect of alloxan on spontaneous lipolysis and glutathione system in isolated rat adipocytes. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.151, p.314-317, 2011.

JIANG, Z. Y.; WOOLARD, A. C. S.; WOLF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. **Lipids**, v.24, p.861-869, 1991.

JOHANSEN, J. S.; et al. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovasc Diabet.**, v.4, n.5, 2005.

KAKKAR, R.; et al. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetes rats. **Mol Cell Biochem.**, v.151, n.2, p.113-119, 1995.

KAVANAGH, K.L.; ELLING, R.A.; WILSON, D.L. Structure of *Toxoplasma gondii* LDH1: active-site differences from human lactate dehydrogenases and the structural basis for efficient APAD⁺ use. **Biochemistry**, v.43, p.879–889, 2004.

KHULLAR, M.; et al. Oxidative stress: a key contributor to diabetic cardiomyopathy. **Can J Physiol Pharmacol**, v.88, p.133-240, 2010.

KIRSTEN, V.R.; SESTERHEIM, P.; SAITOVITCH, D. Animal models for type 1 diabetes studies. **Medicina**, v.43, n.1, p.3-10, 2010.

KRAEGEN, E.W.; et al. Dose-response curves for *in vivo* insulin sensitivity in individual tissues in rats. **Am. J. Physiol**, v. 248, p353–62, 1985.

KRINSKI, N.I. Mechanism of action of biological antioxidants. **Proc Soc Exp Biol Med.**, v. 200, p.248-254, 1992.

KUIPER, G.G.; et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. **Endocrinology**, v.138, p.863– 870, 1997.

KUMAR, G.; MURUGESAN, A.G.; RAJASEKARA, P.M. Effect of *Helicteres isora* bark extract on blood glucose and hepatic enzymes in experimental diabetes. **Oharmazie**, v.61, p.353-355, 2006.

KUROKI, T.; ISSHIKI, K.; KING, G.L. Oxidative stress: the lead or supporting actor in the pathogenesis of diabetic complications. **J Am Soc Nephrol.**, v.14, p.216-220, 2003.

LAGOUGE, M.; et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. **Cell**, v.127, p.1109–1122, 2006.

LANDRY, J., SLAMA, J.T., STERNGLANZ, R. Role of NAD in the deacetylase activity of the SIR2-like proteins. **Biochem Biophys Res Commun**, v.278, p.685–690, 2000.

LAPOLLA, A.; FEDELE, D.; TRALDI, P. Glyco-oxidation in diabetes and related diseases. **Clin. Chim. Acta.**, v.357, n.2, p.236-250, 2005.

LEZEN, S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v.51, p.216-226, 2008.

LIKIDLILID, A.; et al. Glutathione and glutathione peroxidase in type 1 diabetic patients. **J. Med. Assoc. Thai.**, v.90, p.1759–1767, 2007.

LIMA, A.P. **Análise bioquímica e histológica da toxicidade do fígado e rins de ratos**. 2009. 132f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José dos Campos, 2009.

LOPASCHUCK, G.D.; FOLMES, C.D.L.; STANLEY, W.C. Cardiac energy metabolism in obesity. **Cir Res.**, v.101, p. 335-347, 2007.

LOPASCHUK, G.D.; et al. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. **Physiol Rev**, v. 90, p. 207-258, 2010.

LOPASCHUK, G.D.; REBEYCA, I.M.; ALLARD, M.F. Metabolic modulation. A means to mend a broken heart. **Circulation**, v.105, p.140-142, 2002.

LOPES-VIRELLA, M. F.; STONE, P.; ELLIS, S. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by different methods. **Clin Chem.**, v.13, n.5, p.882-884, 1977.

MAJITHIYA, I.B.; BALARAMAN, R. Time-dependent changes in antioxidant enzymes and vascular reactivity of aorta in streptozotocin-induced diabetic rats treated with curcumin. **J, Cardiovasc Pharmacol.**, v.46, p.697-705, 2005.

MALLET, R.T.; et al. Metabolic cardioprotection by pyruvate: recent progress. **Exp Biol Med.**, v. 230, p. 435-443, 2005.

MARCO, R.H.; et al. Oxidant/antioxidant status and hyperfiltration in young patients with type 1 diabetes mellitus. **Pediatr Nephrol**, v. 24, p. 121-127, 2009.

MARITIN, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINGS, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A Review. **J Biochem Mol Toxicol.**, v.17, n.1, p.24-38, 2003.

MARTIN, S.; et al. E. Effects of insulin on intracellular GLUT4 vesicles in adipocytes: evidence for a secretory mode of regulation. **J. Cell Sci**, v.113, p.3427–38, 2000.

MARX, J. Unraveling the causes of diabetes. **Science**, v.296, p.686-689, 2002.

MATHUR, S.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Accelerated atherosclerosis, dyslipidemia, and oxidative stress in end-stage renal disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.11, p.141-147, 2002.

MILNE, J.C.; et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. **Nature**, v.450, p.712-716, 2007.

MOURA, R. A. **Técnicas de laboratório**. 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 1982.

MOVAHED, A.; et al. Resveratrol protects adult cardiomyocytes against oxidative stress mediated cell injury. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.527, p.74-80, 2012.

MULEC, H. JOHNSON, S.A.; BJOK, S. Relation between serum cholesterol and diabetic nephropathy. **Lancet**, v.335, p.1537-1540, 1990.

NAKAMURA, M.; HOJODA, S.; HAYASHI, K. Purification and properties of rats liver glutathione peroxidases. **Biochim Biophys Acta.**, v.358, p.251-261, 1974.

NILSSON, S.; et al. Mechanisms of estrogen action. **Physiol Rev**, v.81, p.1535–1565, 2001.

NISHIYAMA, Y.I.; et al. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. **Am Heart J.**, v.135, p.115-120, 1998.

NOGUEIRA, F. N.; et al. Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. **Clinica Chimica Acta.**, v.353, n.1-2, p.133-139, 2005.

NOVELLI, E.L.B. **Nutrição e vidasaudável – estresse oxidativo e metabolismo energético.** Ribeirão Preto: Tecmed, 2005.

OBERLEY, L. W. Free radicals and diabetes. **Free Radical Biology & Medicine.**, v.5, p.113-125, 1988.

ORSOLIC, N.; et al. DNA-protective effects of quercetin or narigerin in alloxan-induced diabetic mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.656, p.110-113, 2011.

OTANI, H. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. **Journal of Neurochemistry**, v.80, p.780-787, 2002.

OZCELIK, D.; et al. Evaluation of trace elements and oxidative stress levels in the liver and kidney of streptozotocin-induced experimental diabetic rat model. **Gen Physiol Biophys**, v.30, p.356-363, 2011.

PALSAMY, P. SUBRAMANIAN, S. Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v.62, p.598-605, 2008.

PALSAMY, P.; SUBRAMANIAN, S. Amelorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidation stress, and pancreatic β -cell dysfunction in streptozotocin. **Journal of Cellular Physiology**, v.224, p.423-432, 2010.

PARVEEN, K.; et al. Modulatory effects of pycnogenol in rat model of insulin-dependent diabetes mellitus: biochemical, histological, and immunohistochemical evidences. **Protoplasma**, v.250, p.250-347, 2013.

PATEL, S.S.; GOYAL, R.K. Cardioprotective effects of gallic acid in diabetes-induced myocardial dysfunction in rats. **Pharmacognosy Research**, v.3, p.239-245, 2011.

PEDERSON, B.A.; et al. Glucose metabolism in mice lacking muscle glycogen synthase, **Diabetes**, v.54, p.3466–3473, 2005.

PEREIRA, B.; et al. Changes in the TBARs content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidases activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of adrenomedullated rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.827-833, 1998.

PHILLIPS, M.; et al. Increased breath biomarkers of oxidative stress in diabetes mellitus. **Clinica Chimica Acta.**, v.344, n.1-2, p.189-194, 2004.

PUNITHA, I.S.R.; RAJENDRAN, K.; SHIRWAIKAR, A. Alcoholic stem extract of *Coscinium fenestratum* regulates carbohydrate metabolism and improves antioxidant status in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, p.375-381, 2005.

RAMESH, B.; PUGALENDI, K.V. Impact of umbelliferone on erythrocyte redox status in STZ-diabetic rats. **Yale J. Biol. Med.**, v.78, p.131-138, 2005.

REBOLLEDO, O.R.; DATO, S.M.A. Postprandial hyperglycemia and hyperlipidemia-generated glycoxidative stress: its contribution to the pathogenesis of diabetes complications. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.9, p.191-208, 2005.

REIS, J.S.; et al. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo1. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.52, p.1096-1105, 2008.

RESNICK, H. E.; HOWARD, B. V. Diabetes and cardiovascular disease. **Annu. Rev. Med.**, v.53, p.245-267, 2002.

ROCHA, K. K. R.; et al. Resveratrol toxicity: Effects on risk factors for atherosclerosis and hepatic oxidative stress in standard and high-fat diets. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.1362–1367, 2009.

ROCHA, K. K. R.; et al. Weekend ethanol consumption and high-sucrose diet: resveratrol effects on energy expenditure, substrate oxidation, lipid profile, oxidative stress and hepatic energy metabolism. **Alcohol and Alcoholism**, v.46, n.1, p.10–16, 2011.

RODGERS, J.T.; PUIGSERVER, P. Fasting dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.104, p.12861–12866, 2007.

ROEHRIG, K.; ALLRED, J. B. Direct enzymatic for the determination of liver glycogen. Analytical and flavonoids after oral and intravenous administration. **Free Radic Biol Med.**, v.27, n.3-4, p.278-286, 1974.

ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.212, p.67-178, 2006.

ROSEN, P.; et al. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: A summary of a Congress Series sponsored by UNESO MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. **Diabetes Metab Res Rev.**, v.17, p.189-912, 2001.

SADE, G.; et al. Changes in expression profiles of antioxidant enzymes in diabetic rat kidneys. **Diabetes Metab Res Rev.**, v.28, p.228-235, 2012.

SAEED, M.K.; DENG, Y.; DAI, R. Attenuation of biochemical parameters in streptozotoci-induced diabetic rats by oral administration of extracts and farctions of *Cephalotaxus sinensis*. **Journal of Clinical Biochemistry & Nutrition**, v.43, p.21-28, 2008.

SANCHES-VERA, I.; et al. Changes in plasma lipids and increased low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in pregnancies complicated by gestational diabetes: consequences of obesity. **Metabolism: Clinical & Experimental**, v.56, p.2527-1533, 2007.

SARKHAIL, P.; et al. Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidants enzymes in experimental diabetes. **Pharmacol. Res.**, v.56, n.p.61-266, 2007.

SAXENA, A. K.; et al. Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. **Biochemical Pharmacology**, v.45, n.3, p.539-542, 1993.

SCARANO, W. R.; et al. Long-term effects of developmental exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate: Proliferative and inflammatory disorders and a possible role of androgens. **Toxicology**, v.262, p.215–223, 2009.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Annal Biochem.**, v.25, p.192-205, 1968.

SEIVA, F.R.F.; et al. Growth hormone and heart failure: oxidative stress and energetic metabolism in rats. **Growth Horm IGF Res.**, v.18, p.275-283, 2008.

SEKAR, D.S.; SIVAGNANAM, K.; SUBRAMANIAN, S. Antidiabetic activity of *Momordica charantia* seeds streptozotocin induced diabetic rats. **Pharmazie**, v.60, n.5, p.283-387, 2005.

SHEWADE, Y.; TIRTH, S.; BHONDE R. R. Pancreatic islet-cell viability, functionality and oxidative status remain unaffected at pharmacological concentrations of commonly used antibiotics in vitro. **J Biosci.**, v.26, n.3, p.349-355, 2001.

SIES, H. Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy. **Academic Press: San Diego, CA**, 1997.

SILVA, A.M.O.; et al. Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos¹. **Rev. Nutr.**, v.24, n.1, p.121-130, 2011.

SIMMONS, R. A. Developmental origins of diabetes: The role of oxidative stress. **Free radical and biology medicine**, v.40, p.917-922, 2006.

SINDHU, RK.; et al. Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapy. **Clin. Exp. Hypertens.**, v.26, n.1, p.43-53, 2004.

SLOT, J.W.; et al. Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. **J Cell Biol**, v.113, p.23–135, 1991.

SOLEAS, G.J.; DIAMANDIS, E.P.; GOLDBERG, D.M. The world of resveratrol. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.492, p.159–182, 2001.

SOLONI, F. G. Simplified manual micromethod for determination of serum triglycerides. **Clin Chem.**, v.17, n.6, p.531-534, 1971.

STANLEY, W.C.; SABBAH, H.N. Metabolic therapy for ischemic disease. **Heart Fail Rev.**, v.10, p.275-279, 2005.

STEIN, S.; et al. SIRT1 decreases Lox-1-mediated foam cell formation in atherogenesis. **Eur Heart J**, v.31, p.2301–2309, 2010.

SU, H.C.; LIN; H.; H.; CHEN, J.K. Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.290, p.E1339–E1346, 2006.

SULAIMAN, M.; et al. Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.298, p.H833-H843, 2010.

SUN, C.; et al. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin resistant conditions by repressing PTP1B. **Cell Metab**, v.6, p.307–319, 2007.

TACHI, Y.; et al. Hyperglycemia in diabetic rats reduces the glutathione content in the aortic tissue. **Life Science**, v.69, p.1039-1047, 2001.

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st century. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**, v.298, p.141–45, 2010.

TIETZE, F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. **Anal Biochem.**, v.27, p.502-522, 1969.

TOBIN, K.A.; et al. Crosstalk between fatty acid and cholesterol metabolism mediated by liver X receptoralpha. **Mol Endocrinol**, v.14, p.741-752, 2000.

TSAI, S.H., LIN-SHIAU, S.Y., LIN, J.K. Suppression of nitric oxide synthase and the downregulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. **Br J Pharmacol**, v.126, p.673–80, 1999.

UGOCHUKWU , N. H.; COBOURNE, M. K. Modification of renal oxidative stress and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats treated with extracts from *Gongronema latifolium* leaves. **Clinica Chimica Acta.**, v.336, n.1-2, p.73-81, 2003.

VALASTYAN, S.; et al. Novel transcriptional activities of vitamin E: inhibition of cholesterol biosynthesis. **Biochemistry**, v.47, p.744-752, 2008.

VASSORT, G.; TURAN, B. Protective role of antioxidants in diabetes-induced cardiac dysfunction. **Cardiovasc Toxicol.**, v.10, p.73-86, 2010.

VICENTINI, J.; et al. Association among microalbuminuria and oxidative stress biomarkers in patients with type 2 diabetes. **J. Invest. Med.**, v.59, n.4, p.649-654, 2011.

VIZIRI, N.D.; LIANG, K.; PARK, J.S. Acquired lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency in nephrotic syndrome. **American Journal Physiology**, v.49, p.823-829, 2001.

VIZIRI, N.D.; SATO, T. LIANG, K. Molecular mechanism of altered cholesterol metabolism in focal glomerulosclerosis. **Kidney International**, v.632, p.1756-1763, 2003.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

VOLOSHYNA, I.; et al. Resveratrol in Cholesterol Metabolism and Atherosclerosis. **J Med Food**, v.15, p.763–773, 2012.

WANG, Z.; et al. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. **Int J Mol Med**, v.9, p.77–9, 2002.

WESTBROOK, R.; et al. Alteration in oxygen consumption, respiratory quotient, and heat production in long-lived GHRKO and ames dwarf mice, and short-lived bGH transgenic mice. **Journal of Gerontology: Biological Science**, v.64, p.443-451, 2009.

WHITTON, P.D.; HEMS, D.A. Glycogen synthesis in the perfused liver of streptozotocin-diabetic rats. **Biochem. J.**, v.150, p.153–165, 1975.

WILD, S. H.; et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v.27, p.1047-1053, 2004.

WILKINSON, J. H. **Introducción al diagnóstico enzimático**. 3.ed. Buenos Aires: Ediciones Toray, 1965. 310p.

WILLIAMS, R.; AIREY, M. Epidemiology and public health consequences of diabetes. **Current Medical Research and Opinion**, v.18, n.1, p.1-12, 2002.

WOLD, L.; CEYLAN, A.; REN, J. Oxidative stress and stress signaling: menace of diabetic cardiomyopathy. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.26, p.908-917, 2005.

WOOD, J.G.; et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. **Nature**, v.430, p.686–689, 2004.

WYKE, S.M.; TISDALE, M.J. Induction of protein degradation in skeletal muscle by a phorbol ester involves upregulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. **Life Sci**, v.78, p.2898–2910, 2006.

YAMAMOTO, T.; SADOSHIMA, J. Protection of the heart against ischemia/reperfusion by silent information regulator 1. **Trends Card Med**, v.21, p.27-32, 2011.

YING, X.; et al. Resveratrol protects against hyperglycemia-induced oxidative damage to mitochondria by activating SIRT1 in rat mesangial cells. **Toxic and Applied Pharm.**, v.259, n.3, p.395-401, 2012.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 929p, 1996.

ZHANG, J. The direct involvement of SIRT1 in insulin-induced insulin receptor substrate-2 tyrosine phosphorylation. **J. Biol. Chem.**