Rodrigo Gimenes

Influência da Inibição da NADPH Oxidase Sobre o Remodelamento Cardíaco de Ratos com Diabetes Mellitus

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação "Fisiopatologia em Clínica Médica" da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, para obtenção de título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica – Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Adj. Katashi Okoshi

BOTUCATU 2013 Rodrigo Gimenes

Influência da Inibição da NADPH Oxidase Sobre o Remodelamento Cardíaco de Ratos com Diabetes Mellitus

Orientador: Prof. Adj. Katashi Okoshi

BOTUCATU 2013

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

Gimenes, Rodrigo.

Influência da inibição da NADPH oxidase sobre o remodelamento cardíaco de ratos com diabetes mellitus / Rodrigo Gimenes. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Katashi Okoshi Capes: 40101100

1. Stress oxidativo. 2. Miocárdio – Doenças. 3. Diabetes. 4. Rato como animal de laboratório. 5. Enzimas.

Palavras-chave: Apocinina; Estresse oxidativo; Miocardiopatia diabética; Ratos; Remodelação cardíaca.



Dedico este trabalho primeiramente a DEUS, por sempre guiar meus passos, iluminar meu caminho e me manter perseverante em todos os momentos de minha vida.

E aos meus PAIS, pelo apoio, amor e pelos ensinamentos que formaram os alicerces de minha história.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, sempre presente em minha vida.

Ao Prof. Adjunto Dr. KATASHI OKOSHI, meu orientador, pela dedicação em ensinar, empenho em orientar a execução desta dissertação e pelo estímulo ao pensamento reflexivo.

À Prof^a. Adjunta Dr^a. Marina Politi Okoshi, por toda contribuição e ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a. SILMÉIA GARCIA ZANATI BAZAN e ao Prof. Dr. JOÃO CARLOS HUEB pelas valiosas contribuições no exame de qualificação, importantes para a redação final da tese.

À minha irmã CAMILA GIMENES pela ajuda fundamental na realização desta dissertação.

Aos meus amigos e companheiros incansáveis Camila M. Rosa, Dijon Campos, Gabriel N. Guirado e Marcelo Cezar, que sempre colaboraram prontamente para realização deste trabalho.

Aos amigos de laboratório: Camila Bonomo, Aline, Luana, Ricardo, Dani Guizoni, Dani Tomaz, Fernanda, Ana Paula, Priscila, Isabella, Raquel. Muito obrigado pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho.

Ao Prof. Adjunto Dr. FRANCISCO RAFAEL MATINS LAURINDO, do Departamento de Cardio-Pneumologia, da Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo, à pesquisadora Dr^a. Denise de Castro Fernandes e a técnica do laboratório Maria Bertoline pela análise da atividade da NADPH oxidase.

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

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica: ALEXANDRE L. LOUREIRO, ANA MARIA MENGUE, BRUNO JOSÉ FAJIOLLI, ELISÂNGELA A. SILVA, LAURA A. CÂMARA, MÁRIO A. DALLAQUA, RENATO B. PEREIRA e aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela atenção e profissionalismo. À FAPESP e ao CNPQ, pelo suporte financeiro recebido durante a elaboração da pesquisa.

A TODA MINHA FAMÍLIA, que sempre me incentivou e torceu pela minha vitória.

À minha namorada MARIANI, pelo apoio emocional.

A TODOS AMIGOS que estiveram ao meu lado durante essa caminhada e que agora vibram com a minha conquista.



Resumo	1
Abstract	4
Introdução	7
Objetivo	11
Material e Métodos	13
Resultados	
Discussão	47
Conclusão	53
Referências	55

LISTA DE ABREVIATURAS

- A' média: pico da velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral (média aritmética das velocidades das paredes lateral e septal)
- AE: dâmetro do átrio esquerdo
- AO: diâmetro da aorta
- APO: apocinina
- AS: área seccional transversa do cardiomiócito
- CaCl₂: cloreto de cálcio
- CO2: dióxido de carbono
- CTL: grupo controle
- DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
- DHE: dihidroetídio
- DM: diabetes mellitus
- DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
- E/A: razão entre as ondas E e A do fluxo diastólico transmitral
- E/E': razão entre as ondas E e E'
- E' média:pico da velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral (média aritmética das velocidades das paredes lateral e septal)
- EDPP: espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo
- EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
- EOH: 2-hidroxietídeo
- EROs: espécies reativas de oxigênio
- ERVE: espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo
- FC: frequência cardíaca
- FCI: fração colágena intersticial
- FE : fração de ejeção do ventrículo esquerdo
- **GSH-Px:** glutationa peroxidase
- H₂O₂: peróxido de hidrogênio
- HCI: ácido clorídrico
- HOP: hidroxiprolina
- HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência
- IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo
- **ISO:** isoproterenol
- KCI: cloreto de potássio

KH₂PO₄: fosfato de potássio

MDA: malonaldeído

MgSO₄: sulfato de magnésio

MVE: massa do ventrículo esquerdo

NaCI: cloreto de sódio

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NaHCO3: bicarbonato de sódio

O2: oxigênio

Onda A: pico de velocidade do enchimento diastólico tardio

Onda E: pico de velocidade do enchimento diastólico inicial

PAS: pressão arterial sistólica

PC: peso corporal

PCF: peso corporal final

PCI: peso corporal inicial

PP30: pós-pausa de 30 segundos

S' média:pico da velocidade de deslocamento sistólico do anel mitral (média aritmética das velocidades das paredes lateral e septal)

SOD: superóxido dismutase

STZ: estreptozotocina

TD: tensão desenvolvida máxima

TDE: tempo de desaceleração da onda E

TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida

TR: tensão de repouso

TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico

TRIVn: tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela frequência cardíaca

U/S: razão entre os pesos úmido e seco

VD: ventrículo direito

VE: ventrículo esquerdo

VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo

%∆ endo: porcentagem de encurtamento endocárdico do ventrículo esquerdo

[Ca⁺²]_o: concentração extracelular de cálcio

+dT/dt: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida

-dT/dt: velocidade máxima de queda da tensão desenvolvida

%∆ endo: porcentagem de encurtamento endocárdico



O diabetes mellitus (DM) está associado a diversas doenças vasculares e cardíacas. Nos últimos anos, aumentaram as evidências de que pacientes diabéticos são acometidos por uma forma de doença miocárdica denominada miocardiopatia diabética. O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), causado por alterações metabólicas induzidas pelo DM, é um dos principais mecanismos desencadeadores de alterações miocárdicas. A maior fonte de EROs no sistema cardiovascular está relacionada a atividade da família de enzimas da NADPH oxidase. Em relação ao DM, há evidências de que a elevação da glicose sérica, induzida por estreptozotocina em camundongos ou em pacientes diabéticos, causa aumento na atividade da NADPH oxidase nos vasos. Sendo o sistema NADPH oxidase o principal responsável por desequilíbrio no sistema de produção e eliminação de EROs, e também por estar envolvido em muitas patologias cardíacas, estudos à respeito de seu bloqueio têm aumentado nos últimos anos. O objetivo do presente trabalho foi analisar a influência da inibição da NADPH oxidase por apocinina sobre o remodelamento cardíaco de ratos com DM. Foram utilizados ratos Wistar machos com 6 meses de idade, divididos em 4 grupos: controle (CTL, n=15), controle+apocinina (CTL+APO, n=20), diabético (DM, n=20) e diabético+apocinina (DM+APO, n=20). O diabetes foi induzido por estreptozotocina. Após 7 dias, foi iniciado tratamento com apocinina e mantido por 8 semanas. A avaliação estrutural e funcional in vivo do coração foi realizada por ecocardiograma. O estudo funcional in vitro foi realizado em músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo (VE) em condições basal e após estimulação com manobras inotrópicas (contração pós-pausa, aumento da concentração extracelular de cálcio e adição de isoproterenol à solução nutriente). Para análise de variáveis anatômicas foram medidos os pesos úmidos e secos do VE, ventrículo direito (VD), átrios, pulmão e fragmento do fígado. Cortes histológicos do VE foram utilizados para medida da fração colágena intersticial. As enzimas antioxidantes glutationa peroxidase (GSH-Px), catalase e superóxido dismutase (SOD) foram dosadas no soro. Amostras do VE foram utilizadas para medidas da concentração de hidroxiprolina e quantificação do estresse oxidativo através da dosagem de malonaldeído (MDA) e análise da atividade da NADPH oxidase. As comparações entre os grupos foram realizadas

por ANOVA, esquema fatorial 2x2. Ao final do experimento, o peso corporal (PC) foi estatisticamente menor e a glicemia maior nos animais diabéticos. O estudo ecocardiográfico mostrou aumento do átrio esquerdo, do diâmetro diastólico do VE e de sua massa normalizados pelo PC nos animais diabéticos, e a apocinina não interferiu nesses índices. Os índices de função sistólica do VE in vivo mostraramse comprometidos nos grupos diabéticos; no entanto, a apocinina não causou alterações nesses índices. Em relação a função diastólica, houve aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico, e a apocinina aumentou a razão onda E/onda A do fluxo transmitral nos animais diabéticos. Na análise do músculo papilar, ocorreu comprometimento contrátil e de relaxamento nos animais diabéticos, tanto em condição basal quanto nas manobras inotrópicas positivas. A tensão desenvolvida máxima (TD), após manobras de estimulação inotrópica, foi menor no grupo DM em relação ao CTL; no entanto, o grupo DM+APO apresentou melhora da função, embora estatisticamente não significante em relação aos grupos CTL+APO e DM. No estudo anatômico, os pesos do VE, VD e átrios normalizados pelo PC foram maiores nos grupos diabéticos. Na relação peso úmido/seco, apenas o fígado apresentou-se maior no grupo diabético. A concentração de hidroxiprolina foi maior nos grupos diabéticos em relação aos grupos controle, e a apocinina causou elevação adicional nos animais diabéticos. A medida da fração de colágeno instersticial foi maior no grupo DM, e a apocinina atenuou esse efeito. As enzimas antioxidantes séricas foram menores no grupo DM em relação ao CTL, e a apocinina foi benéfica nas enzimas catalase e SOD. A quantificação do estresse oxidativo miocárdico não apresentou diferença entre os 4 grupos estudados. Concluindo, a apocinina proporciona melhora da função diastólica ventricular, da função contrátil miocárdica e das enzimas antioxidantes séricas, sem alterar a atividade da NADPH oxidase dos cardiomiócitos em ratos com diabetes mellitus.

Palavras-chave: Miocardiopatia diabética; Remodelação cardíaca; Estresse oxidativo; Apocinina; Ratos.



Diabetes mellitus (DM) is associated with cardiac and vascular diseases. In recent years, there has been increased evidence that diabetic patients are affected by a form of myocardial disease known as diabetic cardiomyopathy. High production of reactive oxygen species (ROS), caused by diabetes-induced metabolic changes, is one of the main mechanisms leading to myocardial damage. A major source of ROS in the cardiovascular system is related to the activity of NADPH oxidase enzymes family. In streptozotocin-induced diabetic mice or in diabetic patients, serum glucose elevation increases NADPH oxidase activity in vessels. As NADPH oxidase is involved in imbalance of ROS production and elimination systems, and in pathophysiology of cardiac diseases, research on its blockade has increased in recent years. The purpose of this study was to analyze the influence of NADPH oxidase inhibition by apocynin on cardiac remodeling in rats with DM. Six month old male Wistar rats were assigned into 4 groups: control (CTL, n=15), control+apocynin (CTL+APO, n=20), diabetic (DM, n=20) and diabetic+apocynin (DM+APO, n=20). Diabetes was induced by streptozotocin. Seven days later, apocynin was initiated and maintained for 8 weeks. In vivo cardiac structures and functions were assessed by echocardiography. In vitro left ventricular (LV) functional study was performed in isolated papillary muscle preparation at basal condition and after inotropic stimulation with post-rest contraction, increase of extracellular calcium concentration, and addition of isoproterenol to the nutrient solution. Wet and dry weights of LV, right ventricle (RV), atria, lung, and liver sample were measured. LV histological sections were used to analyze interstitial collagen fraction. Antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase, and superoxide dismutase (SOD) were measured in serum. LV tissue samples were obtained for determination of hydroxyproline concentration and quantification of oxidative stress [measurement of malondialdehyde (MDA) and NADPH oxidase activity]. Comparisons between groups were performed by the $2x^2$ factorial ANOVA. At the end of the experiment, body weight (BW) was lower and glucose levels higher in diabetic animals. Echocardiogram showed increased left atrial diameter, LV diastolic diameter, and LV mass normalized by BW in diabetic animals; apocynin did not affect these indices. In vivo LV systolic function was impaired in diabetic groups

and unchanged by the treatment. Isovolumic relaxation time was increased in diabetic animals, and transmitral E/A waves ratio was higher in DM+APO compared to DM group. In vitro LV functional study showed impaired contractile function and relaxation in diabetic animals, at baseline and after inotropic estimulation. The maximum developed tension (DT), after inotropic stimulation, was lower in DM group than CTL; however, the DM+APO group showed improved function, although without difference statistically compared to CTL+APO and DM. LV, RV, and atria weights normalized by BW were higher in diabetic groups. Liver wet-to-dry weights ratio was greater in DM group compared to CTL. Myocardial hydroxyproline concentration was increased in diabetic groups compared to controls, and higher in DM+APO than DM group. Interstitial collagen fraction was higher in DM group, and apocynin attenuated this effect. Serum antioxidant enzymes were lower in DM group than CTL, and apocynin was beneficial in catalase and SOD enzymes. Myocardial oxidative stress did not differ between the groups. In conclusion, apocynin improves ventricular diastolic function, myocardial contractile function, and serum antioxidant enzymes without changing cardiomyocytes NADPH oxidase activity in rats with diabetes mellitus.

Keywords: Diabetic cardiomyopathy; Cardiac remodeling; Oxidative stress; Apocynin; Rats.



Diabetes mellitus (DM) é considerado um grupo de desordens metabólicas caracterizado por hiperglicemia crônica em decorrência de deficiência na secreção e/ou ação da insulina. A hiperglicemia resultante está relacionada a danos e falência de vários órgãos, estando associada a doenças vasculares e cardíacas, incluindo hipertensão arterial sistêmica, doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca; sendo que 75% dos pacientes diabéticos morrem por algum evento cardiovascular (Kannel *et al.*, 1974; Selvin *et al.*, 2004; Voltarelli *et al.*, 2009).

Atualmente, o DM pode ser considerado uma epidemia mundial, provocando enorme desafio para a saúde pública de todo o mundo. O envelhecimento populacional, a urbanização e o estilo de vida pouco saudável como o sedentarismo, dieta inadequada e a obesidade são os principais responsáveis pelo aumento da incidência e prevalência do diabetes (Ministério da Saúde, 2006).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o número de portadores de DM foi de 194 milhões em todo o mundo no ano de 2003, com expectativa de alcançar 333 milhões de pessoas em 2025 (Graziano, 2008).

Nos últimos anos, aumentaram evidências de que pacientes diabéticos são acometidos por uma forma de doença miocárdica conhecida como miocardiopatia diabética, a qual não está relacionada à doença arterial coronariana ou à hipertensão arterial sistêmica (Boudina *et al.*, 2007; Drimal *et al.*, 2008; Linthout *et al.*, 2008; Herz *et al.*, 2010).

A miocardiopatia diabética, considerada uma das principais causas de aumento de morbidade e mortalidade na população diabética, é caracterizada por uma mudança fenotípica no músculo cardíaco. Apresenta-se também por prolongamento na duração do potencial de ação e prejuízo da função ventricular, inicialmente durante a diástole (Dutta *et al.*, 2001). Além disso, disfunção sistólica também tem sido observada em vários estudos (Joffe *et al.*, 1999; Trost *et al.*, 2002; Gonzalez-Vilchez *et al.*, 2005). Dentre os prováveis fatores responsáveis pela miocardiopatia diabética podem ser mencionados alterações metabólicas, hipertrofia miocárdica, fibrose intersticial miocárdica, apoptose, doença microvascular, disfunção autonômica, comprometimento da produção energética, alterações na homeostase intracelular de cálcio e alterações nas proteínas contráteis do miocárdio (Dutta et al., 2001; Poornima *et al.*, 2006; Asghar *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Privratsky *et al.*, 2010).

O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), causado por alterações metabólicas induzidas pelo DM, é um dos principais mecanismos desencadeadores de alterações miocárdicas (Xu *et al.*, 2002; Aydemir-Koksoy *et al.*, 2010).

Vários estudos têm relatado aumento do estresse oxidativo no coração de ratos diabéticos (Kaul *et al.*, 1996; Aragno *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011). As enzimas catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GSH-Px) fazem parte do sistema de defesa antioxidante. Essas enzimas impedem e/ou controlam a formação de radicais livres e espécies não radicais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que resultam em propagação e amplificação do processo e, em consequência, a ocorrência de danos oxidativos (Ferreira & Matsubara, 1997; Schneider & Oliveira, 2004; Barbosa *et al.*, 2010).

Espécies reativas de oxigênio efetivamente contribuem em doenças cardiovasculares como pressão arterial elevada, aterosclerose, hipertrofia miocárdica e insuficiência cardíaca, além de lesões decorrentes de isquemia e reperfusão. Muitos sistemas enzimáticos produzem EROs e seus derivados no sistema vascular, incluindo a ciclo-oxigenase, lipoxigenase, citocromo P450, xantina oxidase, mieloperoxidase, óxido nítrico sintase e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (Onozato & Tojo, 2005; Rabêlo *et al.*, 2010).

A maior fonte de EROs no sistema cardiovascular está relacionada a atividade da família de enzimas da NADPH oxidase. Estudos experimentais recentes sugerem papel importante da NADPH oxidase na fisiopatologia cardíaca, relatando aumento da expressão e atividade de NADPH oxidase em cardiomiócitos e células endoteliais na hipertrofia cardíaca experimental por sobrecarga de pressão, e sugere também papel das EROs, derivadas dessa oxidase, na gênese da disfunção contrátil cardíaca (Li *et al.*, 2002; Murdoch *et al.*, 2006).

Em relação ao DM, há evidências de que a elevação da glicose sérica, induzida por estreptozotocina em camundongos ou em pacientes diabéticos,

causa aumento na atividade da NADPH oxidase nos vasos (Ding *et al.*, 2007; Guzik *et al.*, 2002). Estudos em animais diabéticos também têm demonstrado elevação da atividade da NADPH oxidase no miocárdio ventricular associado à hipertrofia do cardiomiócito, deposição colágena, apoptose e comprometimento da função contrátil (Privratsky *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2009; Thandavarayan *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). Sendo o sistema NADPH oxidase o principal responsável por desequilíbrio no sistema de produção e eliminação de EROs, e também por estar envolvido em muitas patologias cardíacas, estudos à respeito de seu bloqueio têm aumentado nos últimos anos (Dusting *et al.*, 2005).

Vários inibidores farmacológicos da NADPH oxidase têm sido isolados e estudados. Um deles, a apocinina, isolada da planta medicinal *Picrorhiza kurroa*, tem sido amplamente utilizada para bloquear a atividade da NADPH oxidase desde os anos 80 (Heumüller *et al.*, 2008; Touyz, 2008). A apocinina inibe a liberação de ânion superóxido pela NADPH oxidase, bloqueando a migração de p47phox à membrana que está criticamente envolvida na formação do complexo funcional NADPH oxidase. O mecanismo bioquímico subjacente das ações da apocinina foi elucidado em células fagocitárias (Ximenes *et al.*, 2007). A reatividade do radical apocinina com compostos tiol é, possivelmente, o mecanismo envolvido no efeito inibitório da apocinina sobre o complexo NADPH oxidase (Touyz, 2008; Wang *et al.*, 2008).

Os poucos estudos disponíveis sobre a administração da apocinina em modelo experimental de miocardiopatia diabética têm sugerido efeito benéfico nas alterações miocárdicas observadas nessa patologia (Privratsky *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). No entanto, a literatura dispõe de limitado número de estudos a respeito da inibição da NADPH oxidase sobre o remodelamento cardíaco.



Analisar a influência da inibição da NADPH oxidase por apocinina sobre o remodelamento cardíaco em ratos com diabetes mellitus.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Constituição dos Grupos

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com 6 meses de idade, pesando aproximadamente 460 g, provenientes do Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (CEEA 867-2011).

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

- Controle (CTL, n=15): animais que receberam ração comercial e água *ad libitum*
- Controle + apocinina (CTL+APO, n=20): animais que receberam apocinina, ração comercial e água *ad libitum*
- Diabético (DM, n=20): animais diabéticos que receberam ração comercial e água *ad libitum*
- Diabético + apocinina (DM+APO, n=20): animais diabéticos que receberam apocinina, ração comercial e água *ad libitum*

A indução de DM foi realizada por meio da administração intraperitoneal de estreptozotocina (*Sigma Chemicals Co.*), em dose única, na concentração de 50 mg/kg de peso corporal, diluída em tampão citrato 0,1 M pH 4,5 (Hebden *et al.*, 1986; Ozdemir *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2010). Os dois grupos controle (CTL e CTL+APO) receberam tampão citrato. As amostras de sangue foram retiradas, após 7 dias, pela punção da cauda e a glicemia foi determinada através de glicosímetro (Advantage®). Os animais que apresentaram concentração de glicose acima de 220 mg/dL foram considerados diabéticos (Babu & Srinivasan, 1999). Após confirmação do estado diabético, os ratos pertencentes ao grupo CTL+APO e DM+APO passaram a receber, diariamente, o inibidor da NADPH oxidase, apocinina (*Sigma Chemicals Co.*), na concentração de 16 mg/kg/dia diluída na água dos animais, durante 8 semanas (Asaba *et al.*, 2005; Shi & Vanhoutte, 2008; Olukman *et al.*, 2010).

O consumo de água foi medido diariamente, além disso, os animais foram pesados semanalmente.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais, sendo mantidos em ambiente com temperatura (25±2°C) e fotoperíodo (ciclos 12/12 horas claro/escuro) controlados.

Aferição da Pressão Arterial

A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida na cauda do animal, ao final do período experimental, utilizando-se o método da pletismografia (Pfeffer *et al.*, 1971). Os ratos foram colocados em uma caixa de madeira (50x40 cm), forrada com maravalha de pinus autoclavada, à temperatura de 40° C por 5 minutos com a finalidade de causar vasodilatação da artéria caudal. Para aferição da PAS foi utilizado o eletro-esfigmomanômetro *Narco Bio-System*^{*}, modelo 709-0610 (*International Biomedical Inc.*, USA). O manguito foi posicionado em torno da cauda do animal e conectado a transdutor de pressão (*Gould*, OH, USA). Em seguida, o manguito foi insuflado a um valor superior à pressão arterial sistólica e desinsuflado. O registro das curvas de pressão arterial foi feito por um polígrafo (*Gould*, modelo RS 3200, OH, USA).

Estudo Ecocardiográfico

O ecocardiograma foi realizado ao final do período experimental. Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg, i.p.) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg, i.p.). Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em leve decúbito lateral esquerdo para a realização do exame. Foi utilizado o equipamento modelo HDI-5000 da Philips, equipado com transdutor eletrônico multifrequencial de 5-12 MHz. Para realizar as medidas estruturais do coração, foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo-M) orientado pelas imagens em modo bidimensional, com o transdutor em posição para-esternal, eixo menor. A avaliação do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares (Simone *et al.*, 1992; Litwin *et al.*, 1995; Okoshi

et al., 2004). As imagens da aorta e do átrio esquerdo foram obtidas posicionando o cursor do modo-M ao nível do plano da valva aórtica. As imagens obtidas no modo-M foram registradas em uma impressora (Sony Co., modelo UP-895, Japan). Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas. manualmente, com o auxílio de um paquímetro (*Mitutoyo*, Japan). As seguintes estruturas foram medidas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE; espessuras diastólicas da parede posterior do VE (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV); diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A espessura relativa do VE (ERVE) foi calculada dividindo-se o DDVE pela EDPP multiplicada por dois. A massa do VE (MVE) foi calculada pela fórmula [(DDVE + EDPP + EDSIV³ - (DDVE)³] x 1,04, onde 1,04 representa a densidade específica do miocárdio (Litwin et al., 1995; Paiva et al., 2003). O índice de MVE (IMVE) foi calculado normalizando a MVE para o peso corporal. A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico (% Δ endo) [(DDVE - DSVE) / DDVE]; 2) fração de ejeção [(DDVE³ - DSVE³) / DDVE³]; 3) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior. A função diastólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) pico de velocidade do enchimento diastólico inicial (onda E); 2) pico de velocidade do enchimento diastólico tardio (onda A); 3) razão entre as ondas E e A (E/A); 4) tempo de desaceleração da onda E (TDE); 3) tempo de relaxamento isovolumétrico em valores absolutos (TRIV) e normalizados pela frequência cardíaca (TRIVn). A avaliação conjunta da função diastólica e sistólica do VE foi realizada pelo índice de desempenho miocárdico também conhecido por índice de Tei (soma do tempo de contração isovolumétrica e TRIV, dividido pelo tempo de ejeção do VE) (Tei et al., 1997). O estudo foi complementado pela avaliação por Doppler tissular dos deslocamentos sistólico (S'), diastólico inicial (E') e tardio (A') do anel mitral (média aritmética das velocidades de deslocamento das paredes lateral e septal), e pela razão entre as ondas E e E' (E/E').

Estudo do Músculo Isolado

A avaliação funcional do músculo isolado foi realizada no dia seguinte à realização do ecocardiograma, de acordo com os procedimentos rotineiramente realizados em nosso laboratório (Cicogna *et al.*, 2000; Cicogna *et al.*, 2001; Sugizaki *et al.*, 2005). Sob anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.), os animais foram submetidos a toracotomia mediana. O coração foi rapidamente removido e colocado em solução de Krebs-Henseleit, à temperatura de 28° C, previamente oxigenada (10 minutos) com 95% de oxigênio (O_2) e 5% de dióxido de carbono (CO_2). A composição da solução de Krebs-Henseleit, em milimoles por litro, é: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 2,52 CaCl₂; 1,16 MgSO₄; 1,18 KH₂PO₄; 5,50 glicose e 25,88 NaHCO₃ (Krebs & Henseleit, 1932).

dissecção do ventrículo direito e Após corte no septo interventricular, o VE foi dividido em duas partes, cada uma contendo o seu músculo papilar e, em seguida, dissecados numa placa de vidro contendo solução descrita acima. O músculo de aspecto macroscópico mais adequado teve suas extremidades presas a anéis de aço inoxidável e, a seguir, o músculo papilar foi transferido para câmara de vidro contendo solução de Krebs-Henseleit, constantemente oxigenada com 95% de O_2 e 5% de CO_2 e mantida à temperatura de 28° C, graças ao uso de banho circulante (PAPST, K-5058). O pH da solução foi mantido entre 7,38 a 7,42 e a pressão parcial de oxigênio entre 550 a 660 mmHg. O músculo papilar foi mantido em posição vertical na câmara de vidro. O anel inferior foi ligado a fio de aço inoxidável de 0,38 mm de diâmetro, conectado a transdutor de força (*Kyowa* 120T 20B) e o superior conectado a fio de aço, semelhante ao anterior, preso à extremidade do braço longo de uma alavanca isotônica. Sobre esta extremidade localiza-se um micrômetro que permite ajustar o comprimento de repouso do músculo. Na extremidade do braço curto da alavanca foi suspenso, por fio de aço, peso de 2,5 a 5,0 g, denominado pré-carga, que tem por finalidade promover o estiramento inicial do músculo papilar.

O músculo foi estimulado 12 vezes por minuto por meio de eletrodos de platina tipo agulha (E8 - Grass), posicionados paralelamente ao eixo longitudinal do músculo. Os eletrodos foram acoplados a estimulador elétrico, programado para liberar estímulos em onda quadrada de 5 ms. A voltagem de estímulo utilizada, 12 a 15 volts, corresponde a valor 10% acima do mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo.

Após período de 60 minutos no qual o músculo permaneceu sob contrações sem desenvolver força (contração isotônica) foi colocada pós-carga de 50 g. A carga total (pré-carga + pós-carga) impediu que o músculo encurtasse passando a desenvolver somente força (contração isométrica). Após estabilização do músculo em contração isométrica, este foi progressivamente estirado, por meio do micrômetro, até a força desenvolvida atingir o seu valor máximo. O comprimento de estiramento da fibra muscular que corresponde a força ou tensão máxima desenvolvida, em contração isométrica, denomina-se Lmax. Após atingir Lmax, o músculo foi novamente colocado em contração isotônica durante 5 minutos. A seguir, o músculo papilar foi recolocado em contração isométrica, para determinação final de Lmax. O registro das variáveis foi iniciado após verificar-se que o músculo permaneceu estável em contração isométrica durante 15 minutos. Os seguintes parâmetros foram analisados: tensão desenvolvida (TD), tensão de repouso (TR), tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida (TPT), velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida (+dT/dt) e velocidade máxima de queda da tensão desenvolvida (-dT/dt). As contrações isométricas foram registradas utilizando sistema de aquisição de dados computadorizado (Acqknowledge* MP100, Biopac Systems Inc.). Com o objetivo de comparar o desempenho de músculos de tamanhos diferentes, os valores de TD, TR, +dT/dt e -dT/dt foram normalizados pelas respectivas áreas seccionais.

As variáveis morfológicas utilizadas para caracterizar os músculos papilares foram: comprimento (mm), peso (mg) e área seccional (AS, mm²). O comprimento (Lmax) foi medido com o auxílio de catetômetro Gartner (*Gartner Scientific Corporation*). A porção muscular entre os anéis de aço foi cortada, submetida à secagem com papel filtro e pesada. Considerando-se que o músculo papilar possui forma cilíndrica, é uniforme e apresenta peso específico aproximado de 1,0, a AS foi calculada dividindo-se o peso pelo comprimento.

O estudo funcional *in vitro* foi complementado por manobras que aumentam a contratilidade miocárdica, com a finalidade de avaliar a reserva

contrátil. Após o período de estabilização em Lmax, foi realizada a manobra de pós-pausa, que consiste em analisar a primeira contração muscular após repouso de 30 segundos. Passados 10 minutos, foi trocada a solução nutriente de Krebs-Henseleit para outra com concentração extracelular de Ca⁺⁺ de 0,625 mM, deixando o músculo se estabilizar por 10 minutos; a seguir, foi realizada elevação de cálcio para 1,25 mM e 2,50 mM, com cinco minutos de intervalo entre cada concentração. Após essas manobras, o músculo foi recolocado em solução nutriente com Ca⁺⁺ de 1,25 mM, deixando-se estabilizar por 10 minutos. A seguir, foi realizada adição de isoproterenol na concentração de 10⁻⁶ M e, após 10 minutos de estabilização, os parâmetros foram obtidos.

Análise Histológica do Coração

Após a pesagem dos ventrículos direito e esquerdo, foram cortados fragmentos da parte central do VE, com 3 a 5 mm de espessura. O material foi imerso em formalina 10% neutra e tamponada, durante 72 horas, a 4° C. Após esse período, o tecido foi lavado, desidratado e incluído em parafina. Cortes histológicos com 5 a 7 μ m de espessura foram submetidos à coloração por hematoxilina e eosina, para quantificação do diâmetro dos miócitos, e a coloração por *picrosirius red* para quantificação do colágeno miocárdico.

A análise morfométrica foi realizada utilizando-se uma câmara de vídeo acoplada a um microscópio Leica, com objetiva 40 X, conectado a computador equipado com um programa analisador de imagem (*Image-Pro Plus 3.0, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA*). Em secções transversas do VE, serão medidos os menores diâmetros transversos de, no mínimo, 50 fibras cardíacas nas quais o núcleo possa ser claramente identificado (Ahmet *et al.*, 2005). Para avaliação do colágeno nas lâminas coradas por *picrosirius red*, foi utilizada a videodensitometria. Retidas as imagens, os componentes do tecido cardíaco foram identificados, segundo o realce de cor. Os filamentos de colágeno refletem a cor vermelha, enquanto os miócitos são vistos na cor amarela. Áreas contendo vasos sanguíneos foram excluídas da análise.

Análise Macroscópica Post-Mortem

O grau de hipertrofia foi avaliado pelos pesos dos ventrículos direito e esquerdo e dos átrios e pela razão entre os pesos úmidos dessas estruturas e o peso corporal dos animais. Após a retirada do coração do tórax, foram colhidos o pulmão e fragmentos do fígado para determinação da razão peso úmido/peso seco desses órgãos. As razões entre os pesos úmidos e secos também foram calculadas para os átrios e ambos os ventrículos. A razão peso úmido/seco reflete a quantidade de líquido no tecido.

Quantificação de Hidroxiprolina

A hidroxiprolina é um aminoácido presente exclusivamente no tecido colágeno. A determinação de sua concentração no miocárdio, juntamente com a medida da fração de colágeno intersticial, são duas técnicas habitualmente utilizadas para quantificar o tecido colágeno miocárdico.

A concentração miocárdica de hidroxiprolina foi mensurada em tecido miocárdico obtido da ponta do VE, de acordo com o método descrito por Switzer (1991) e padronizado em nosso laboratório por Matsubara *et al.* (2000).

Inicialmente foram obtidas as soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina (diluição 60 μ L HOP / 2940 μ L HCl) e a solução branca (água destilada). Previamente à execução do processamento bioquímico, foi necessária a preparação dos seguintes reagentes químicos: tampão borato 0,2 M (pH 8,7), tiossulfato de sódio 3,6 M e o reagente de Ehrlich. O processamento bioquímico para determinação da concentração de hidroxiprolina foi iniciado por secagem das soluções-padrão e das amostras no concentrador de amostras (*Speed Vac*). A hidrólise ácida foi realizada mediante adição de HCl 6 N em cada um dos tubos das amostras, que foram aquecidas na estufa à 100° C por 8 horas. A oxidação foi realizada após retirada e resfriamento dos tubos da estufa. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 minutos e colocadas novamente no concentrador de amostras (*Speed Vac*) por 3 horas. Retiradas as amostras, foi

adicionado em cada uma, 1 mL de água destilada e tamponadas com solução tampão borato 0,2 M pH 8,7; após 20 minutos, a reação foi inibida com a solução tiossulfato de sódio 3,6 M e as amostras agitadas. Posteriormente, a solução foi saturada com KCl e colocada em banho-maria a 90° C. Os tubos foram resfriados e neles adicionados 2,5 mL de tolueno e, em seguida, foram agitados por 5 minutos para a separação das fases água e tolueno. Foram retirados 1,5 mL de tolueno da solução e estes foram colocados em tubos de hemólise para serem acrescentados 0,6 mL de solução de Ehrlich. As amostras foram mantidas em repouso por 30 minutos a fim de se alcançar a estabilidade do cromógeno. A leitura foi realizada por espectrofotometria com filtro de 565 nm.

Glicemia e Atividade Oxidativa Sérica

Após a anestesia dos ratos e antes da retirada do coração para estudo do músculo papilar, os animais foram decapitados e o sangue coletado. O soro foi separado por centrifugação a 4000 rpm, por 15 minutos, e foi utilizado para determinação de glicose, glutationa peroxidase (GSH-Px), catalase e superóxido dismutase (SOD).

A glicemia foi determinada por ação da glicose-oxidase, que 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 antipirilquinonimina, de cor vermelha. A intensidade de coloração é proporcional à concentração de glicose (Soloni, 1971; Moura, 1982).

A GSH-Px foi analisada utilizando o tampão fosfato 0,15 M, pH 7,0, contendo 5 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 0,1 mL de 0,0084 M NADPH, 0,005 mL GSSG redutase, 0,01 mL de 1,125 M NaN₃ e 0,1 mL 0,15 M GSH (forma reduzida da glutationa) (Nakamura *et al.*, 1974).

A atividade da SOD foi determinada baseada na habilidade da enzima de inibir a redução do nitro azul de tetrazólio (NBT), o qual tem sido gerado pela hidroxilamina 37,5 mM (*Carlo Erba, Milan, Italy*) em solução alcalina (Crouch *et al.*, 1981). Atividade da catalase foi determinada utilizandose solução tampão fosfato, pH 7,0 a 240 nm.

Quantificação do Estresse Oxidativo Miocárdico

O estresse oxidativo foi analisado por meio da quantificação de malonaldeído (MDA) no miocárdio. A geração total de EROs foi avaliada pelos produtos de oxidação derivados do dihidroetídio (DHE) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para elucidar a fonte de EROs, a atividade da NADPH oxidase foi avaliada pela oxidação do DHE (composto 2-hidroxietídeo, EOH) por HPLC e por fluorometria.

Quantificação de Malonaldeído Miocárdico

Parte do sobrenadante obtido para análise de atividade enzimática foi utilizado para quantificação de hidroperóxido de lipídeo e malonaldeído. A concentração de hidroperóxido de lipídeo foi determinada por espectrofotometria utilizando-se *kit* disponível comercialmente. A quantificação de malonaldeído foi realizada por HPLC.

Avaliação da Geração de Superóxido por Produtos de Oxidação Derivados do DHE por HPLC

O tecido miocárdico foi lavado em PBS para remoção de coágulos sanguíneos e trombos. O tecido foi cortado em fragmentos com peso aproximado de 200 mg. O tecido foi incubado em 500 μ L de solução PBS/DTPA contendo DHE 150 μ M por 30 minutos a 37° C em ambiente sem luz. A seguir, o tecido foi lavado com PBS, transferido para nitrogênio líquido, homogeneizado e ressuspenso em solução de acetonitrila. O lisado foi centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4° C (Fernandes *et al.*, 2007; Laurindo *et al.*, 2008). O sobrenadante foi então utilizado para avaliar a geração de superóxido por

produtos de oxidação derivados do DHE por HPLC, de acordo com método previamente descrito por Fernandes *et al.* (2007) e Laurindo *et al.* (2008).

Avaliação da Atividade da NADPH Oxidase em Frações de Membrana Celular por Oxidação do DHE

A atividade da NADPH oxidase foi avaliada em frações de membrana celular pela quantificação da fluorescência de produtos da oxidação do DHE (composto EOH) que foi detectada por meio de HPLC e por fluorometria em microplaca, conforme detalhadamente descrito por Fernandes *et al.* (2007) e Laurindo *et al.* (2008).

Análise Estatística

Os dados numéricos são expostos como média ± desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75% de acordo com a distribuição normal ou não normal. Para as comparações entre os grupos foi utilizada a técnica da análise de variância (ANOVA) complementados por cálculos ou testes recomendados para o esquema fatorial 2 X 2, de acordo com a distribuição probabilística (Zar, 1999). As comparações consideradas de interesse entre os quatro grupos foram as seguintes: CTL vs. CTL+APO; CTL vs. DM; CTL + APO vs. DM+APO; e DM vs. DM+APO. Todas as conclusões estatísticas são discutidas no nível de significância de 5% (p<0,05).


Peso corporal, Glicemia e Pressão arterial Sistólica

Os valores de PC inicial e final, assim como da PAS dos quatro grupos experimentais, estão apresentados na Tabela 1.

Variáveis	CTL (n=13)	CTL+APO (n=19)	DM (n=17)	DM+APO (n=16)
PCI (g)	460(447-503)	461(442-493)	467(443-498)	469(443-490)
PCF (g)	543±53	519±52	316±43*	313±44 [#]
PAS (mmHg)	118±10,3	114±11,5	129±12,6*	131±14,8 [#]

Tabela 1. Peso corporal dos animais

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle e apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético e apocinina; PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; PAS: pressão arterial sistólica. *: p<0,05 vs. CTL; *: p <0,05 vs. CTL + APO (ANOVA + esquema fatorial 2x2).

Não houve diferença estatisticamente significante quanto ao PC inicial entre os grupos. O PC final foi menor nos grupos diabéticos em relação aos seus respectivos controles (Gráfico 1).





A pressão arterial sistólica, medida ao final do período experimental, foi maior nos grupos diabéticos em relação aos seus respectivos controles (Gráfico 2). Não houve interferência da apocinina nas variáveis PC e PAS.



Gráfico 2: Pressão arterial sistólica dos animais ao final do experimento. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL; #: p <0,05 vs. CTL+APO.</p>

Avaliação Ecocardiográfica

A Tabela 2 apresenta as variáveis estruturais cardíacas obtidas por ecocardiograma. A FC foi menor nos grupos diabéticos. O DDVE, AE e MVE normalizados pelo PC foram significantemente maiores nos grupos diabéticos em relação aos seus controles (Gráfico 3, 4 e 5). Embora os valores da EDPP e EDSIV tenham sido menores nos grupos diabéticos, a ERVE não foi diferente entre os grupos. O DSVE foi maior nos grupos diabéticos, no entanto não atingiu diferença estatisticamente significante. A apocinina não influenciou os valores dessas variáveis.

Variáveis	CTL (n=13)	CTL+APO (n=19)	DM (n=17)	DM+APO (n=16)
FC	277±28	271±30	237±37*	247±43 [#]
DDVE	8,39±0,62	8,24±0,49	8,03±0,51	7,82±0,65 [#]
DDVE/PC	15,6±2,15	16,0±1,74	25,7±2,87 *	25,3±3,13 [#]
DSVE	3,92±0,48	3,87±0,62	4,11±0,62	4,16±0,58
EDPP	1,47±0,07	1,47±0,07	1,37±0,08 *	1,32±0,08 [#]
EDSIV	1,48±0,07	1,48±0,06	1,38±0,08 *	1,33±0,08 [#]
ERVE	0,34(0,32-0,37)	0,36(0,33-0,38)	0,33(0,32-0,36)	0,33(0,32-0,36)
AO	3,90(3,80-4,10)	4,00(3,90-4,20)	3,80(3,70-3,83)	3,80(3,70-3,85) [#]
AE	5,76±0,95	5,92±0,63	5,68±0,77	5,35±0,81 [#]
AE/AO	1,46±0,16	1,46±0,16	1,49±0,19	1,42±0,24
AE/PC	10,8±2,35	11,6±1,91	18,1±2,35 *	17,3±3,03 [#]
MVE	0,90±0,11	0,89±0,10	0,76±0,10 *	0,70±0,12 [#]
IMVE	1,68±0,27	1,71±0,26	2,44±0,32 *	2,25±0,32 [#]

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

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle e apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético e apocinina; FC: frequência cardíaca (bpm); DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE) (mm); PC: peso corporal (kg); DSVE: diâmetro sistólico do VE (mm); EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE (mm); EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular (mm); ERVE: espessura relativa da parede do VE; AO: diâmetro da aorta (mm); AE: diâmetro do átrio esquerdo (mm); MVE: massa do VE (g); IMVE: índice de massa do VE (g/kg). *: p<0,05 vs. CTL; #: p<0,05 vs. CTL+APO (ANOVA + esquema fatorial 2x2).



Gráfico 3: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corporal (DDVE/PC). CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL; [#]: p <0,05 vs. CTL+APO.</p>



Gráfico 4: Diâmetro do átrio esquerdo normalizado pelo peso corporal (AE/PC). CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL; #: p <0,05 vs. CTL+APO.</p>





Os resultados da avaliação funcional do VE por meio do ecocardiograma estão expostos na Tabela 3. Observa-se comprometimento consistente da função sistólica nos grupos diabéticos comparados aos respectivos controles (menores valores da %∆ endo, FE, VEPP e S' média), e a apocinina não causou qualquer efeito nessas variàveis (Gráfico 6, 7 e 8).

Variáveis	CTL (n=13)	CTL+APO (n=19)	DM (n=17)	DM+APO (n=16)
$\%\Delta$ endo	53,3±4,90	53,3±5,45	49,0±5,19 *	46,9±5,59 [#]
FE	0,90±0,03	0,89±0,03	0,86±0,04 *	0,85±0,05 [#]
VEPP	38,1±3,84	37,2±3,51	27,9±2,21 *	30,2±5,35 [#]
E	74,1(72,5-80,0)	74,0(73,0-81,5)	67,0(64,8-73,3) *	71,5(68,0-77,5)
А	53,0(46,0-55,0)	49,0(43,5-60,0)	50,0(46,5-58,8)	51,0(42,5-57,5)
E/A	1,46±0,16	1,55±0,28	1,29±0,20	1,47±0,30 [§]
TDE	47,2±6,31	44,9±6,14	47,2±4,74	41,0±5,58 [§]
TRIV	28,9±2,63	30,1±3,12	38,6±6,05 *	38,6±4,56 [#]
TRIVn	62,0±6,26	63,7±7,12	76,2±11,3 *	78,0±9,20 [#]
Теі	0,55±0,06	0,53±0,06	0,57±0,10	0,56±0,06
S' média	3,50(3,25-3,56)	3,50(3,50-3,75)	3,00(3,94-3,00)*	3,00(2,50-3,00) [#]
E' média	4,29±0,51	4,16±0,60	3,78±0,73	3,84±0,93
A' média	3,75(3,19-4,44)	3,75(3,31-5,56)	3,75(3,44-4,56)	4,38(3,50-5,25)
E/E'	18,3±3,51	18,8±3,40	18,4±3,01	19,7±3,86

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

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle e apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético e apocinina; % Δ endo: porcentagem de encurtamento endocárdico; FE: fração de ejeção; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (mm/s); E: pico da velocidade do enchimento diastólico inicial (cm/s); A: pico da velocidade do enchimento diastólico tardio (cm/s); TDE: tempo de desaceleração da onda E (ms); TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico (ms); TRIVn: TRIV normalizado pela frequência cardíaca; Tei: índice de performance miocárdica; S': pico da velocidade de deslocamento diastólico inicial (E') e tardio (A') do anel mitral (média das paredes lateral e septal). *: p<0,05 vs. CTL; [#]: p<0,05 vs. CTL; [§]: p<0,05 vs. DM (ANOVA + esquema fatorial 2x2).



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



Gráfico 7: Velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo (VEPP). CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL; [#]: p <0,05 vs. CTL+APO.</p>



Gráfico 8: Pico da velocidade de deslocamento sistólico do anel mitral (S` média; média das velocidades das paredes lateral e septal). CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL; #: p <0,05 vs. CTL+APO.

Em relação à função diastólica, o DM causou aumento do tempo de relaxamento do VE que não foi afetado pela apocinina. No entanto, a apocinina induziu aumento da relação E/A e redução do TDE (Gráfico 9 e 10). O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) foi maior nos grupos diabéticos em relação ao controle (Gráfico 11). As variáveis de função diastólica obtidas por Doppler tissular não mostraram diferença entre os grupos.



Gráfico 9: Razão entre o pico da velocidade do enchimento diastólico inicial pelo pico da velocidade do enchimento diastólico tardio (E/A). CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. [§]: p<0,05 vs. DM.</p>







Gráfico 11: Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV). CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL; *: p <0,05 vs. CTL+APO.

Estudo funcional do músculo papilar

Os resultados obtidos do estudo funcional do músculo papilar do VE nas condições basal e após manobras inotrópicas estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Na condição basal, observa-se comprometimento da função contrátil (menor +dT/dt e maior TPT) e de relaxamento (menor -dT/dt) nos grupos diabéticos em relação aos respectivos controles (Gráfico 12, 13 e 14). As demais variáveis não apresentaram diferença significante entre os grupos. A apocinina não influenciou os valores dessas variáveis.

Variáveis	CTL (n=13)	CTL+APO (n=13)	DM (n=12)	DM+APO (n=13)
TD (g/mm ²)	7,53±1,48	7,67±1,20	5,98±2,86	7,23±1,82
+dT/dt (g/mm²/s)	79,9±15,4	78,5±13,6	52,5±25,5 *	63,5±16,5 [#]
TPT (ms)	183±12,5	194±16,6	224±15,6 *	230±12,9 [#]
-dT/dt (g/mm²/s)	32,0±6,17	31,3±6,55	20,7±8,11*	23,8±5,84 [#]
TR (g/mm ²)	1,00±0,31	0,86±0,38	0,85±0,47	0,79±0,25

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

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle e apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético e apocinina TD: tensão desenvolvida máxima; +dT/dt: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida; TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de queda da tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso. *: p<0,05 vs. CTL; [#]: p<0,05 vs. CTL+APO (ANOVA + esquema fatorial 2x2).



Gráfico 12: Velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida (+dT/dt) em condição basal. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL; [#]: p <0,05 vs. CTL+APO.</p>



Gráfico 13: Tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida (TPT) em condição basal. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL; [#]: p <0,05 vs. CTL+APO.</p>



Gráfico 14: Velocidade máxima de queda da tensão desenvolvida (-dT/dt) em condição basal. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL; [#]: p <0,05 vs. CTL+APO.</p>

Os resultados das manobras realizadas para avaliação da reserva contrátil do miocárdio, PP30, elevação de cálcio para 2,5 mM e adição de isoproterenol, não foram diferentes daqueles observados em condição basal, exceto pelo menor valor de TD no grupo DM em relação ao grupo CTL nas três manobras estudadas. A apocinina atenuou a redução da TD nos animais diabéticos nas três manobras supracitadas (Gráfico 15, 16 e 17).

	Variáveis	CTL (n=13)	CTL+APO (n=13)	DM (n=12)	DM+APO (n=13)
	TD	9,47±2,36	9,44±1,97	6,73±3,23 *	8,27±2,29
	+dT/dt	101±23,1	98,7±22,8	58,8±28,1 *	71,6±20,2 [#]
PP30	TPT	194±18,0	199±22,2	237±21,9 *	242±15,2 [#]
	-dT/dt	35,2±7,53	35,4±9,71	20,4±7,91 *	23,1±6,84 [#]
	TR	0,96±0,31	0,80±0,34	0,87±0,49	0,88±0,38
	TD	8,61±2,14	8,95±1,87	6,28±2,94 *	7,60±2,11
10 - +21	+dT/dt	97,3±24,5	99,8±23,0	59,4±28,1 *	73,5±21,1 [#]
[Ca ⁻]₀ 2.5 mM	TPT	173±13,8	177±18,0	211±22,3 *	213±19,7 [#]
, -	-dT/dt	36,8±7,86	38,4±9,68	22,8±9,45 *	27,0±6,64 [#]
	TR	0,83±0,28	0,69±0,32	0,69±0,38	0,67±0,23
	TD	7,79±2,32	7,86±1,63	5,62±2,61 *	6,54±2,06
	+dT/dt	101±28,4	101±19,7	59,8±25,9 *	67,8±17,4 [#]
ISO 10 ⁻⁶ M	TPT	151±10,4	152±13,4	180±17,1 *	186±17,1 [#]
	-dT/dt	55,9±14,7	56,3±13,9	28,3±10,4 *	33,0±9,48 [#]
	TR	0,77±0,33	0,62±0,21	0,59±0,46	0,60±0,30

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

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle e apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético e apocinina; TD: tensão desenvolvida máxima (g/mm²); +dT/dt: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida (g/mm²/s); TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida (ms); -dT/dt: velocidade máxima de queda da tensão desenvolvida (g/mm²/s); TR: tensão de repouso (g/mm²). *: p<0,05 vs. CTL; [#]: p<0,05 vs. CTL; +APO (ANOVA + esquema fatorial 2x2).



Gráfico 15: Tensão desenvolvida máxima (TD) após a manobra de pós-pausa de 30 segundos (PP30). CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL.</p>



Gráfico 16: Tensão desenvolvida máxima (TD) após a manobra de elevação de cálcio para 2,5 mM. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL.</p>



Gráfico 17: Tensão desenvolvida máxima (TD) após a manobra de adição de isoproterenol 10⁻⁶ M. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL.</p>

Análise Macroscópica Post-Mortem

Na Tabela 6 são mostradas as variáveis macroscópicas dos animais dos grupos estudados. As variáveis VE, VD e Átrios mostraram-se menores nos grupos diabéticos em relação aos seus respectivos grupos controles. No entanto, a normalização dessas variáveis pelo PC mostra valores maiores nos grupos diabéticos (Gráfico 18, 19 e 20). A razão entre os pesos úmido e seco (U/S) do VE, VD, átrios e pulmão não mostraram diferença entre os grupos. No entanto, no fígado o valor foi maior no grupo DM comparado ao CTL. Não se observou efeito da apocinina nessas variáveis.

Variáveis	CTL (n=13)	CTL+APO (n=13)	DM (n=12)	DM+APO (n=13)
VE	0,89(0,77-0,91)	0,90(0,81-0,95)	0,57(0,53-0,65)*	0,60(0,52-0,70)#
VE/PC	1,79(1,72-1,92)	1,72(1,60-1,79)	2,12(2,01-2,28)*	2,11(2,01-2,37)#
VD	0,24±0,04	0,25±0,04	0,18±0,03 *	0,19±0,04 [#]
VD/PC	0,50±0,08	0,49±0,05	0,66±0,08 *	0,69±0,09 [#]
Átrios	0,10±0,02	0,10±0,01	0,08±0,01 *	0,08±0,01 [#]
Átrios/PC	0,20±0,04	0,20±0,02	0,28±0,05 *	0,30±0,04 [#]
VE (U/S)	3,73(3,53-3,92)	3,81(3,67-4,00)	3,90(3,82-4,25)	4,00(3,66-4,03)
VD (U/S)	4,10±0,17	4,13±0,10	4,15±0,18	4,14±0,20
Átrios (U/S)	4,63(4,42-4,69)	4,61(4,44-4,74)	4,68(4,48-4,81)	4,74(4,54-5,05)
Pulmão(U/S)	4,63(4,55-4,74)	4,62(4,52-4,66)	4,51(4,43-4,62)	4,57(4,34-4,65)
Fígado (U/S)	3,03(2,99-3,05)	3,05(2,99-3,08)	3,12(3,05-3,17)*	3,09(3,04-3,26)

Tabela 6. Variáveis anatômicas dos animais

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle e apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético e apocinina; VE: ventrículo esquerdo (g); PC: peso corporal (kg); VD: ventrículo direito (g); Átrios: g; U/S: razão entre os pesos úmido e seco. *: p<0,05 vs. CTL; [#]: p<0,05 vs. CTL+APO (ANOVA + esquema fatorial 2x2).



Gráfico 18: Peso do ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corporal (VE/PC). CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL; *: p <0,05 vs. CTL+APO.</p>



Gráfico 19: Peso do ventrículo direito normalizado pelo peso corporal (VD/PC). CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL; [#]: p <0,05 vs. CTL+APO.</p>



Gráfico 20: Peso dos átrios normalizado pelo peso corporal (Átrios/PC). CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL; #: p <0,05 vs. CTL+APO.</p>

Concentração de Hidroxiprolina e Fração Colágena Intersticial Miocárdica

A medida do diâmetro dos miócitos em amostras do VE dos animais não mostraram diferença estatisticamente significante entre os grupos (Gráfico 21). A concentração de hidroxiprolina miocárdica mostrou-se maior nos grupos diabéticos em relação aos seus respectivos grupos controles, e o grupo DM+APO apresentou-se maior em relação ao grupo DM. A fração colágena intersticial miocárdica foi maior no grupo DM em relação ao CTL, e o grupo DM+APO não se mostrou diferente em relação aos grupos DM e CTL+APO, mostrando efeito benéfico da apocinina em animais diabéticos (Tabela 7 e Gráficos 22-23).

Tabela I. Concentração de muroxipronna e mação colagena intersticiar miocardic	Tabela 7. Concent	tração de hid	roxiprolina	e fração co	lágena int	ersticial i	miocárdica
---	-------------------	---------------	-------------	-------------	------------	-------------	------------

Variáveis	CTL	CTL+APO	DM	DM+APO
HOP VE	2,13±0,15	2,16±0,19	2,51±0,24 *	2,81±0,32 ^{#§}
Miócito	15,8±2,29	15,9±1,55	15,3±1,39	17,2±2,17
FCI VE (%)	2,14±1,29	1,74±0,90	5,05±2,98 *	3,12±1,35

Valores expressos em média e desvio padrão. HOP VE (n=10); FCI VE (n=8); CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle e apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético e apocinina; HOP VE: concentração de hidroxiprolina no miocárdio do ventrículo esquerdo (mg/g); Miócito: diâmetro do miócito, μ m; FCI VE: fração de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo. *: p<0,05 vs. CTL; [#]: p<0,05 vs. CTL+APO; [§]: p<0,05 vs. DM (ANOVA + esquema fatorial 2x2).



Gráfico 21: Diâmetro dos miócitos. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle
+ apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina.



Gráfico 22: Concentração miocárdica de hidroxiprolina (HOP). CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL; #: p <0,05 vs. CTL+APO; [§]: p<0,05 vs. DM.</p>



Gráfico 23: Fração colágena intersticial do ventrículo esquerdo (FCI VE). CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL.</p>

Glicemia e Atividade Oxidativa Sérica

Os valores obtidos da análise da glicemia e da atividade oxidativa sérica estão expostos na Tabela 8.

Variáveis	CTL (n=8)	CTL+APO (n=8)	DM (n=8)	DM+APO (n=8)
Glicemia	100±22,3	99,6±16,4	599±5,02 *	589±37,3 [#]
GSH-Px	42,2±7,70	25,0±4,41*	30,9±3,43 *	29,5±3,44
Catalase	4,21±1,10	3,88±1,40	1,08±0,58 *	4,43±1,73 [§]
SOD	6,43±0,59	5,65±0,56 *	5,35±0,28 *	6,67±0,80 ^{#§}

Tabela 8. Análise da glicemia e da atividade oxidativa sérica

Valores expressos em média e desvio padrão. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle e apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético e apocinina; Glicemia: mg/dL; GSH-Px: glutationa peroxidase (nmol/mg tecido); Catalase: μ mol/g tecido; SOD: superóxido dismutase (nmol/mg proteína). *: p<0,05 vs. CTL; *: p<0,05 vs. CTL+APO; [§]: p<0,05 vs DM (ANOVA + esquema fatorial 2x2).

A glicemia foi significativamente superior nos grupos diabéticos em relação aos seus respectivos controles. A GSH-Px foi menor no grupo DM em relação ao CTL e não se observou diferença entre os grupos DM+APO e CTL+APO. No entanto, o valor do grupo CTL+APO foi menor em relação ao CTL. Não houve diferença entre os grupos diabéticos. Em relação à catalase, houve redução no grupo DM que foi normalizada pela apocinina. A SOD também foi menor no grupo DM e a apocinina mostrou ser benéfica em animais diabéticos (Gráficos 24, 25 e 26).



Gráfico 24: Glicemia ao final do experimento. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL; *: p <0,05 vs. CTL+APO.</p>



Gráfico 25: Enzima catalase em amostra miocárdica do ventrículo esquerdo. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL; [§]: p<0,05 vs. DM.</p>



Gráfico 26: Enzima superóxido dismutase (SOD) em amostra miocárdica do ventrículo esquerdo. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle + apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético + apocinina. *: p<0,05 vs. CTL; [#]: p <0,05 vs. CTL; [§]: p<0,05 vs. DM.</p>

Quantificação do Estresse Oxidativo Miocárdico e Atividade da NADPH Oxidase em Frações de Membrana

Os valores obtidos da quantificação de estresse oxidativo miocárdico e da análise da atividade da NADPH oxidase não mostraram diferenças significantes entre os 4 grupos (Tabela 10).

Tabela 10.Quantificação do estresse oxidativo miocárdico e atividade da NADPHoxidase em frações de membrana

Variáveis	CTL (n=8)	CTL+APO (n=8)	DM (n=8)	DM+APO (n=8)
MDA (µM/L)	1,26±0,23	1,38±0,27	1,38±0,23	1,25±0,45
DHE (µM)	9,77±2,40	8,32±1,23	9,20±1,94	9,13±1,55
EOH (nM)	36,3±13,0	36,2±10,5	34,9±5,07	29,8±6,38

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle e apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético e apocinina; MDA: malonaldeído; DHE: dihidroetídio; EOH: hidroxietídio. *: p<0,05 vs. CTL; [#]: p<0,05 vs. CTL+APO; [§]: p<0,05 vs. DM (ANOVA + esquema fatorial 2x2).



Neste estudo avaliamos a influência do bloqueio da NADPH oxidase na remodelação cardíaca e a atividade oxidativa de ratos Wistar diabéticos. A indução do estado diabético foi realizada por meio de administração do quimioterápico STZ.

A STZ é uma glicosamina-nitrosuréia que causa morte de células beta pancreáticas, com consequente deficiência na biossíntese e secreção de insulina (Yamamoto *et al.*, 1981; Bedoya *et al.*, 1996). Entre os mecanismos propostos para a citotoxicidade desta substância está a alquilação do DNA e a formação de EROs (Tjalve *et al.*, 1976; Schnedl *et al.*, 1994). A ação intracelular da STZ causa uma cadeia de eventos que resulta na fragmentação do DNA nas células beta pancreáticas. Evidências indicam que a STZ gera EROs que contribuem para fragmentação do DNA. As EROs podem, portanto, ter papel essencial no efeito diabetogênico da STZ (Takasu *et al.*, 1991; Bedoya *et al.*, 1996).

As características metabólicas da indução do DM por STZ incluem o desenvolvimento rápido de hiperglicemia profunda, modesta hipertrigliceridemia, cetose e redução acentuada nos níveis de insulina plasmática (Tahiliani & McNeill, 1986; Feng *et al.*, 2004). No modelo experimental de diabetes tipo 1 os efeitos da hiperglicemia são avaliados na ausência de hiperinsulinemia (Poornima *et al.*, 2006).

No presente trabalho foi utilizada apocinina, substância isolada da planta medicinal *Picrorhiza kurroa*, utilizada amplamente para bloquear a atividade da NADPH oxidase (Heumüller *et al.*, 2008; Touyz, 2008). Na literatura, os trabalhos descrevem a dose utilizada de apocinina que varia de 4 mg/kg/dia (Roe *et al.*, 2011), até 100 mg/kg/dia (Cotter & Cameron, 2003; Shi *et al.*, 2008). Em nosso estudo, foi optado por utilizar a concentração de 16 mg/kg/dia, que é a mais relatada na literatura (Asaba *et al.*, 2005; Olukman *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, a mensuração inicial da glicemia e do peso corporal dos animais mostrou que os grupos CTL, CTL+APO, DM e DM+APO não apresentaram diferença estatisticamente significante, evidenciando a homogeneidade entre os grupos. Conforme esperado para esse modelo experimental, os animais diabéticos apresentaram elevação da glicemia e perda de peso (Gimenes, 2012; Xavier, 2012). A apocinina não foi capaz de atenuar a elevação da glicemia nem a perda de peso.

Em nosso estudo, a pressão arterial apresentou discreto aumento estatisticamente significante nos grupos diabéticos em relação aos seus respectivos controles. Assim não podemos descartar a influência da pressão arterial na remodelação cardíaca induzida por DM. No entanto, não houve diferença entre os grupos diabéticos. Na literatura, há descrições de que o DM induzido por STZ aumenta a pressão arterial (Ramos, 1988; Fein *et al.*, 1991; Takeda *et al.*, 1991), embora outros não tenham observado esse efeito (Yamamoto, 1988; Wienen *et al.*, 2001). Essas alterações estariam relacionadas à volemia ou às diferentes técnicas de medida de pressão arterial (Kusaka *et al.*, 1987; Yamamoto, 1988).

Através do ecocardiograma realizamos a análise *in vivo* das variáveis estruturais do coração, assim como dos parâmetros das funções sistólica e diastólica do VE. Observamos que as variáveis DDVE, AE, MVE eram relativamente menores nos grupos diabéticos. No entanto, os animais diabéticos apresentavam PC significativamente menor. Assim, a normalização dessas variáveis pelo PC mostrou significativo aumento nos valores nos grupos diabéticos em relação aos seus respectivos controles. Sabe-se que a normalização das estruturas cardíacas pelo PC pode acarretar erros de interpretação, uma vez que essas variáveis não são exatamente proporcionais (Moreira *et al.*, 2006). Portanto em nosso estudo, não é possível assumir que houve dilatação do VE e do átrio esquerdo e aumento da MVE. Existem vários relatos na literatura mostrando que o DM provoca dilatação das câmaras cardíacas (Joffe *et al.*, 1999; Akula *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2011). Em nosso estudo, não observamos diferença nos grupos tratados com apocinina.

Os índices de função sistólica do VE mostraram-se comprometidos no grupo DM, uma vez que a % endo, a FE, a VEPP e a S' média foram menores em relação ao grupo controle, e a apocinina não foi capaz de atenuar a redução dos índices acima. A função diastólica também apresentou-se alterada nos grupos diabéticos, tendo em vista o aumento do TRIV, assim como o TRIV normalizado pela frequência cardíaca, e não se alterou com a apocinina, exceto pela razão E/A que aumentou no grupo DM+APO em relação ao DM, atenuando o comprometimento diastólico. Muitos autores, igualmente, relataram prejuízo nas funções sistólica e diastólica do VE, em estudos com ratos diabéticos induzidos por STZ (Joffe *et al.*, 1999; Mihm *et al.*, 2001; Akula *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2010).

O estudo funcional do músculo papilar isolado, em condição basal e após manobras inotrópicas positivas para verificação da reserva contrátil, mostrou comprometimento da contração e de relaxamento nos grupos diabéticos, assim como relatado em trabalhos anteriores do nosso grupo (Gimenes, 2012; Xavier, 2012). A apocinina atenuou a queda da TD nos animais diabéticos nas três manobras inotrópicas positivas.

A avaliação macroscópica mostrou que o peso do VE, VD e dos átrios foram menores nos grupos diabéticos, no entanto, ao normalizar pelo PC, os pesos foram maiores nesses grupos. Considerando as variáveis VE/PC, VD/PC e átrios/PC, podemos supor que o DM causou hipertrofia miocárdica; no entanto, é possível que esse resultado seja apenas efeito da normalização pelo PC. Portanto, o resultado deve ser interpretado com cautela devido a não proporcionalidade exata dessas variáveis (Moreira *et al.*, 2006).

No que diz respeito à relação peso úmido/seco das estruturas cardíacas, pulmão e fígado, não observamos diferenças consistentes entre os grupos. Assim, o grau de congestão dessas estruturas e órgãos não foi influenciado pela apocinina.

Para avaliarmos o tecido colágeno miocárdico realizamos a determinação da concentração miocárdica de hidroxiprolina e medida da fração de colágeno intersticial. A hidroxiprolina é um aminoácido presente exclusivamente no tecido colágeno e a determinação de sua concentração no miocárdio, juntamente com a medida da fração de colágeno intersticial, são duas técnicas habitualmente utilizadas para quantificar o tecido colágeno miocárdico (Matsubara *et al.*, 2000). Nos nossos dados, a concentração de hidroxiprolina está aumentada nos grupos diabéticos, em relação aos seus respectivos controles. Ao contrário do esperado, a apocinina causou aumento do tecido colágeno nos

animais diabéticos. Em relação à fração de colágeno intersticial, entretanto, a apocinina mostrou efeito atenuante nos animais diabéticos.

A relação entre o aumento do estresse oxidativo e os danos causados pelo diabetes, incluindo o miocárdico, é de reconhecida importância (Maritim *et al.*, 2003). Vários estudos têm relatado aumento do estresse oxidativo no coração de ratos diabéticos (Kaul *et al.*, 1996; Aragno *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011). As enzimas catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GSH-Px) fazem parte do sistema de defesa antioxidante. Essas enzimas impedem e/ou controlam a formação de radicais livres e espécies não radicais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que resultam em propagação e amplificação do processo e, em consequência, a ocorrência de danos oxidativos (Ferreira & Matsubara, 1997; Schneider & Oliveira, 2004; Barbosa *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, a análise da atividade oxidativa no soro mostrou que nos grupos diabéticos houve diminuição das enzimas GSH-Px, catalase e SOD, e a apocinina foi capaz de normalizar ou atenuar os níveis de catalase e SOD.

O complexo NADPH oxidase é um dos principais, senão o principal, responsável pela produção do ânion superóxido. A produção desse radical livre é controlada por enzimas antioxidantes, como por exemplo, a SOD. O aumento na produção de superóxido no organismo causa oxidação da dihidroetidina (DHE). A DHE é amplamente utilizada como marcador da produção de ânion radical superóxido, principalmente pela observação por microscopia de fluorescência total em células e tecidos (Bindokas *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1998). Outros oxidantes não são capazes de oxidar a DHE em produtos fluorescentes.

A oxidação da DHE forma os compostos etídio e o 2-hidroxietídeo (EOH), e este último é separado por cromatografia liquida de alta performance (HPLC) com detecção por fluorescência. A formação do EOH está associada à oxidação específica da DHE pelo superóxido, enquanto que a produção de etídeo estaria relacionada à oxidação da DHE por outras espécies reativas (Zhao et al., 2003; Fink et al., 2004; Fernandes, 2007). Assim, a DHE quantificada de células e tecidos representa o estresse oxidativo total, isto é, a soma dos compostos fluorescentes etídio e EOH. O malonaldeído (MDA) é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos compostos medidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). A formação de malonaldeído ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica, que está elevada em situações de estresse oxidativo em sistemas biológicos, células e tecidos (Bonnes & Guérin, 1992).

Em relação às análises de quantificação de estresse oxidativo miocárdico e a atividade da NADPH oxidase não observamos diferenças significativas entre os 4 grupos. A apocinina não teve efeito sobre os grupos tratados. Embora esse resultado possa ser visto como inesperado, uma possível explicação, descrita por Riganti *et al.* (2006), Heumüller *et al.* (2008) e Touyz (2008), seria de que a apocinina atuaria apenas como inibidor do complexo NADPH oxidase em células fagocitárias e na presença de mieloperoxidase. Em células não fagocitárias e na ausência de mieloperoxidase, a apocinina poderia servir apenas como um antioxidante ou em alguns casos como pró-oxidante (Castor *et al.*, 2010).

Resumindo, estudos mostram a importância da apocinina no bloqueio do complexo NADPH oxidase, mas os mecanismos de ação dessa substância e seus benefícios ainda não estão elucidados. Estudos adicionais são necessários para melhorar o entendimento da influência do bloqueio da NADPH oxidase por apocinina na fisiopatologia da miocardiopatia diabética. Em nosso estudo, a apocinina proporcionou discreta melhora da função diastólica ventricular e da função contrátil miocárdica e melhora dos níveis de enzimas antioxidantes. No entanto, o diabetes mellitus e a apocinina não causaram alterações nas variáveis relacionadas à atividade da NADPH oxidase da membrana celular dos cardiomiócitos.



A apocinina proporciona melhora da função diastólica ventricular, da função contrátil miocárdica e das enzimas antioxidantes séricas, sem alterar a atividade da NADPH oxidase dos cardiomiócitos em ratos com diabetes mellitus.



Ahmet I, Wan R, Mattson MP, Lakatta EG, Talan M. Cardioprotection by intermittent fasting in rats. Circulation 2005;112:3115-21.

Akula A, Kota MK, Gopisetty SG, Chitrapu RV, Kalagara M, Kalagara S, *et al.* Biochemical, histological and echocardiographic changes during experimental cardiomyopathy in STZ-induced diabetic rats. Pharmacol Res 2003;48:429-35.

Aragno M, Mastrocola R, Alloatti G, Vercellinatto I, Bardini P, Geuna S, *et al.* Oxidative stress triggers cardiac fibrosis in the heart of diabetic rats. Endocrinology 2008;149:380-8.

Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Quinn MT, Fujita T, *et al*. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. Kidney Int 2005;67:1890-8.

Asghar O, Al-Sunni A, Khavandi K, Khavandi A, Withers S, Greenstein A. Diabetic cardiomyopathy. Clin Sci (Lond) 2009;116:741-60.

Aydemir-Koksoy A, Bilginoglua A, Sariahmetoglub M, Schulzb R, Turan B. Antioxidant treatment protects diabetic rats from cardiac dysfunction by preserving contractile protein targets of oxidative stress. J Nutr Biochem 2010;21:827-33.

Babu PS, Srinivasan K. Renal lesions in streptozotocin-induced diabetic rats maintained on onion and capsaicin containing diets. J Nutr Biochem 1999;10:477-83.

Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. Rev Nutr 2010;23:629-43.

Bedoya FJ, Solano F, Lucas M. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. Experientia 1996;52:344-7. Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, Miller RJ. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. J Neurosci 1996;16:1324-36.

Bonnes-Taourel D, Guérin MC, Torreilles J. Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation? Biochem Pharmacol 1992;44:985-8.

Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. Circulation 2007;115:3213-23.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.

Castor LRG, Locatelli KA, Ximenes VF. Pro-oxidant activity of apocynin radical.Free Radic Biol Med 2010;48:1636-43.

Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Aragon FF, Okoshi MP. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. Am J Med Sci 2000;320:244-8.

Cicogna AC, Padovani C, Okoshi K, Matsubara LS, Aragon FF, Okoshi MP. The influence of temporal food restriction on the performance of isolated cardiac muscle. Nutr Res 2001;21:639-48.

Cohn R, Roth K. Lipid and lipoprotein metabolism. In: Biochemistry and disease, bridging basic science and clinical practice. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996:181-263.

Cotter MA, Cameron NE. Effect of the NAD(P)H oxidase inhibitor, apocynin, on peripheral nerve perfusion and function in diabetic rats. Life Sci 2003;73:1813-24.

Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G, Galbraith RA, Galbraith GM, Buse MG. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. Diabetes 1981;30:235-41.

Ding H, Hashem M, Triggle C. Increased oxidative stress in the streptozotocininduced diabetic apoE-deficient mouse: changes in expression of NADPH oxidase subunits and eNOS. Eur H Pharmacol 2007;561:121-8.

Drimal J, Knezl V, Navarova J, Nedelcevova J, Paulovicova E, Sotnikova R, *et al.* Role of inflammatory cytokines and chemoattractants in the rat model of streptozotocin-induced diabetic heart failure. Endocr Regul 2008;42:129-35.

Dusting GJ, Selemidis S, Jiang F. Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005;100 suppl I:97-103.

Dutta K, Podolin DA, Davidson MB, Davidoff AJ. Cardiomyocyte dysfunction in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. Diabetes 2001;50:1186-92.

Ebrahimian TG, Heymes C, You D, Blanc-Brude O, Mees B, Waeckel L, *et al.* NADPH oxidase-derived overproduction of reactive oxygen species impairs postischemic neovascularization in mice with type 1 diabetes. Am J Pathol 2006;169:719-28.

Fawcett JK, Scott JE. A rapid and precise method for the determination of urea. J Clin Pathol 1960;13:156-9.

Fein FS, Miller B, Flores M, Morton E. Myocardial adaptation to chronic propranolol therapy in diabetic rats. J Cardiovasc Pharmacol 1991;17:846-53.

Feng ZY, Prins JB, Marwick TH. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. Endocr Rev 2004;25:543-67.

Fernandes AA, Novelli EL, Okoshi K, Okoshi MP, Di Muzio BP, Guimarães JF, *et al.* Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. Biomed Pharmacother 2010;64:214-9.

Fernandes DC, Wosniak J, Pescatore LA, Bertoline MA, Liberman M, Laurindo FRM, *et al.* Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. Am J Physiol Cell Physiol 2007;292:C413-22. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Assoc Med Bras 1997;43:61-8.

Fink B, Laude K, McCann L, Doughan A, Harrison DG, Dikalov S. Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay. Am J Physiol Cell Physiol 2004;287:C895-902.

Gimenes C. Influência do exercício físico sobre a remodelação cardíaca e a atividade oxidativa em ratos diabéticos. [Tese de Doutorado]. Botucatu - SP: Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp; 2012.

Gonzalez-Vilchez F, Ayuela J, Ares M, Pi J, Catillo L, Martin-Duran R. Oxidative stress and fibrosis in incipient myocardial dysfunction in type 2 diabetic patients. Int J Cardiol 2005;101:53-8.

Graziano JM. Global burden of cardiovascular disease. In: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, eds. Braunwald's Heart Disease - A Textbook of Cardiovascular Medicine. 8th ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier; 2008. p.1-22.

Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, *et al.* Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. Circulation 2002;105:1656-62.

Hebden RA, Gardiner SM, Bennett T, MacDonald IA. The influence of streptozotocin-induced diabetes mellitus on fluid and electrolyte handling in rats. Clin Sci (Lond) 1986;70:111-7.

Heumüller S, Wild S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HHHW, Busse R, Schröder K, *et al.* Apocynin is not an inhibitor of vascular reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidases but an antioxidant. Hypertension 2008;51:1-7.

Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe2+ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. Lipids 1991;26:853-6.
Joffe II, Travers KE, Perreault-Micale CL, Hampton T, Katz SE, Morgan JP, *et al.* Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced, non-insulin-dependent diabetic rats. J Am Coll Cardiol 1999;34:2111-9.

Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Khaper N, Seneviratne C, Singal PK. Probucol treatment reverses antioxidant and functional deficit in diabetic cardiomyopathy. Mol Cell Biochem 1996;160-161:283-8.

Kim DH, Kim YJ, Kim HK, Chang SA, Kim MS, Sohn DW, *et al.* Usefulness of mitral annulus velocity for the early detection of left ventricular dysfunction in a rat model of diabetic cardiomyopathy. J Cardiovasc Ultrasound 2010;18:6-11.

Krebs H, Henseleit K. Untersuchungen über die Harnstoff-bildung im Turkörper. Hoppe Deylers Z Physiol Chem 1932;210:33-66.

Kusaka M, Kishi K, Sokabe H. Does so-called streptozotocin hypertension exist in rats? Hypertension 1987;10:517-21.

Laurindo FRM, Fernandes DC, Santos CXC. Assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity by HPLC analysis of dihydroethidium oxidation products. Methods Enzymol 2008;441:237-60.

Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. Hypertension 2002;40:477-84.

Li C, Zhang Q, Li M, Zhang J, Yu P, Yu D. Attenuation of myocardial apoptosis by alpha-lipoic acid through suppression of mitochondrial oxidative stress to reduce diabetic cardiomyopathy. Chin Med J 2009;122:2580-6.

Linthout SV, Seeland U, Riad A, Eckhardt O, Hohl M, Dhayat N, *et al.* Reduced MMP-2 activity contributes to cardiac fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. Basic Res Cardiol 2008:103:319-27.

Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. Circulation 1995;91:2642-54.

Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA. Cholesterol determination in highdensity lipoproteins separated by three different methods. Clin Chem 1977;23:882-4.

Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol 2003;17:24-38.

Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000;279:H1534-9.

Mihm MJ, Seifert JL, Coyle CM, Bauer JA. Diabetes related cardiomyopathy time dependent echocardiographic evaluation in an experimental rat model. Life Sci 2001;69:527-42.

Miller FJ Jr, Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. Circ Res 1998;82:1298-305.

Ministério da Saúde. Diabetes Mellitus. Cadernos de Atenção Básica 2006 (16). http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/abcad16.pdf. (Acesso em: 17/08/2010).

Moreira VO, Castro AV, Yaegaschi MY, Cicogna AC, Okoshi MP, Pereira CA, *et al.* Echocardiographic criteria for the definition of ventricular dysfunction severity in aortic banded rats. Arq Bras Cardiol 2006;86:432-8.

Moura R. Técnicas de Laboratório. 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora; 1982.

Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, Shah AM. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. Cardiovasc Res 2006;71:208-15.

Nakamura W, Hosoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. Biochem Biophys Acta 1974;358:251-61.

Olukman M, Orhan CE, Celenk FG, Ulker S. Apocynin restores endothelial dysfunction in streptozotocin diabetic rats through regulation of nitric oxide synthase and NADPH oxidase expressions. J Diabetes Complications 2010;24:415-23.

Okoshi K, Fioretto JR, Okoshi MP, Cicogna AC, Aragon FF, Matsubara LS, *et al.* Food restriction induces *in vivo* ventricular dysfunction in spontaneously hypertensive rats without impairment of *in vitro* myocardial contractility. Braz J Med Biol Res 2004;37:607-13.

Onozato ML, Tojo A. Role of NADPH oxidase in hypertension and diabetic nephropathy. Cur Hypertens Rev 2005;1:15-20.

Ozdemir S, Ugur M, Gürdal H, Turan B. Treatment with AT1 receptor blocker restores diabetes-induced alterations in intracellular Ca^{2+} transients and contractile function of rat myocardium. Arch Biochem Biophys 2005;435:166-74.

Paiva SA, Zornoff LA, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Matsubara BB, *et al.* Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003;284:H2242-6.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Frohlich ED. Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats. J Lab Clin Med 1971;78:957-62.

Poornima IG, Parikh P, Shannon RP. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. Circ Res 2006;98:596-605.

Privratsky JR, Wold LE, Sowers JR, Quinn MT, Ren J. AT1 blockade prevents glucose-induced cardiac dysfunction in ventricular myocytes: role of the AT1 receptor and NADPH oxidase. Hypertension 2003;42:206-12.

Rabêlo LA, Souza VN, Fonseca LJS, Sampaio WO. Redox unbalance: NADPH oxidase as therapeutic target in blood pressure control. Arq Bras Cardiol 2010;94:643-51.

Ramos OL. Diabetes mellitus and hypertension. State of the art lecture. Hypertension 1988;11:114-8

Riganti C, Costamagna C, Bosia A, Ghigo D. The NADPH oxidase inhibitor apocynin (acetovanillone) induces oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol 2006;212:179-87.

Roe ND, Thomas DP, Ren J. Inhibition of NADPH oxidase alleviates experimental diabetes-induced myocardial contractile dysfunction. Diabetes Obes Metab 2011;13:465-73.

Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. Diabetes 1994;43:1326-33.

Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxidação e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. Rev Bras Med Esporte 2004;10:308-13.

Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, *et al*. Metaanalysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. Ann Int Med 2004;141:421-31.

Shi XY, Hou FF, Niu HX, Wang GB, Xie D, Guo ZJ, *et al.* Advanced oxidation protein products promote inflammation in diabetic kidney through activation of renal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. Endocrinology 2008;149:1829-39.

Shi Y, Vanhoutte PM. Oxidative stress and COX cause hyper-responsiveness in vascular smooth muscle the femoral artery from diabetic rats. Br J Pharmacol 2008;154:639-51.

Simone G, Devereux RB, Camargo MJ, Volpe M, Wallerson DC, Atlas AS, *et al.* In vivo left ventricular anatomy in rats with two-kidney, one clip and one-kidney, one clip renovascular hypertension. J Hypertens 1992;10:725-32.

Soloni FG. Simplified manual micromethod for determination of serum triglycerides. Clin Chem 1971;17:529-34.

Stratmann B, Gawlowski T, Tschoepe D. Diabetic cardiomyopathy - to take a long story serious. Herz 2010;35:161-8.

Sugizaki MM, Carvalho RF, Aragon FF, Padovani CR, Okoshi K, Okoshi MP, *et al.* Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to morphological damage in normotensive middle-aged rats. J Biomed Sci 2005;12:641-9.

Switzer B. Determination of hydroxyproline in tissue. J Nutr Biochem 1991;2:229-321.

Tahiliani AG, McNeill JH. Diabetes-induced abnormalities in the myocardium. Life Sci 1986;38:959-74.

Takasu N, Komiya I, Asawa T, Nagasawa Y, Yamada T. Streptozocin- and alloxaninduced H2O2 generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H2O2 as mediator for DNA fragmentation. Diabetes 1991;40:1141-5.

Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, Takeda R. Production of endothelin-1 from the mesenteric arteries of streptozotocin-induced diabetic rats. Life Sci 1991;48:2553-6.

Tei C, Nishimura RA, Seward JB, Tajik AJ. Noninvasive Doppler-derived myocardial performance índex: correlation with simultaneous measurements of cardiac catheterization measurements. J Am Soc Echocardiogr 1997;10:169-78.

Tjalve H, Wilander E, Johansson EB. Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. J Endocrinol 1976;69:455-6.

Touyz RM. Apocynin, NADPH oxidase and vascular cells: a complex matter. Hypertension 2008;51:172-4. Trost SU, Belke DD, Bluhm WF, Meyer M, Swanson E, Dillmann WH. Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. Diabetes 2002;51:1166-71.

Voltarelli JC, Couri CEB, Rodrigues MC, Moraes DA, Stracieri ABPL, Pieroni F, *et al.* Terapia celular no diabetes mellitus. Rev Bras Hematol Hemoter 2009;31 supl 1:149-56.

Wang J, Wang H, Hao P, Xue L, Wei S, Zhang Y, *et al.* Inhibition of aldehyde dehydrogenase 2 by oxidative stress is associated with cardiac dysfunction in diabetic rats. Mol Med 2011;17:172-9.

Wang Q, Smith RE, Luchtefeld R, Sun AY, Simonyi A, Luo R, *et al.* Bioavailabity of apocynin through its conversion to glycoconjugate but not to diapocynin. Phytomedicine 2008;15:496-503.

Wienen W, Richard S, Champeroux P, Audeval-Gerard C. Comparative antihypertensive and renoprotective effects of telmisartan and lisinopril after long-term treatment in hypertensive diabetic rats. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 2001;2:31-6.

Xavier NP. Influência do antioxidante quercetina sobre a remodelação cardíaca e a atividade oxidativa de ratos com diabetes mellitus. [Tese de Doutorado]. Botucatu - SP: Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp; 2012.

Ximenes VF, Kanegae MP, Rissato SR, Galhiane MS. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal for NADPH oxidase inhibition. Arch Biochem Biophys 2007;457:134-41.

Xu Z, Patel KP, Lou MF, Rozanski GJ. Up-regulation of K+ channels in diabetic rat ventricular myocytes by insulin and glutathione. Cardiovasc Res 2002;53:80-8.

Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. Nature 1981;294:284-6.

Yamamoto J. Blood pressure and metabolic effects of streptozotocin in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. Clin Exp Hypertens A 1988;10:1065-83.

Zar J. Bioestatistical analysis. Prentice-Hall Press. 4 ed. New Jersey, NJ, USA.;1999.

Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, *et al.* Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. Free Radic Biol Med 2003;34:1359-68.