



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Camila Moreno Rosa Bassetto

**Inibição Sistêmica da NADPH Oxidase: Estudo do
Coração de Ratos Espontaneamente Hipertensos
com Diabetes Mellitus**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica – Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Adjunto Katashi Okoshi

**Botucatu
2015**

Camila Moreno Rosa Bassetto

**Inibição Sistêmica da NADPH Oxidase: Estudo do
Coração de Ratos Espontaneamente Hipertensos
com Diabetes Mellitus**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Fisiopatologia em Clínica
Médica – Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Adjunto. Katashi Okoshi

Botucatu
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Bassetto, Camila Moreno Rosa.

Inibição sistêmica da NADPH oxidase : estudo do coração de ratos espontaneamente hipertensos com diabetes mellitus / Camila Moreno Rosa Bassetto. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Katashi Okoshi

Capes: 40101100

1. Diabetes. 2. Hipertensão. 3. Stress oxidativo. 4. NADPH Oxidase.

Palavras-chave: Apocinina; Diabetes mellitus; Estresse oxidativo; Hipertensão arterial; Remodelamento cardíaco.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus
pais, MARIA JOSÉ e FRANCISCO e ao
meu marido, IVAN.

Agradecimentos

A DEUS por ter me abençoado na realização desse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Adjunto KATASHI OKOSHI, pela oportunidade e confiança na minha capacidade, pelos ensinamentos e amizade. Obrigada por sua preciosa contribuição em minha vida.

À Profa. Adjunta MARINA POLITI OKOSHI, pelos ensinamentos, apoio, consideração e amizade.

À Profa. Dra. ANA ANGÉLICA HENRIQUE FERNANDES, por todo auxílio e disponibilidade.

Ao Prof. Titular ANTONIO CARLOS CICOGLIA por disponibilizar o Laboratório de Músculo Papilar Isolado e pelos aprendizados.

Ao Prof. Adjunto Dr. FRANCISCO RAFAEL MARTINS LAURINDO, do Departamento de Cardio-Pneumologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, à pesquisadora Dra. DENISE DE CASTRO FERNANDES e à técnica do laboratório MARIA BERTOLINI pela análise da atividade da NADPH oxidase.

Ao Prof. Catedrático Dr. ADELINO LEITE MOREIRA, do Departamento de Fisiologia e Cirurgia Cardiorrespiratória, da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto - Portugal, à pesquisadora Profa. Dra. INÊS FALCÃO PIRES pela quantificação dos produtos finais de glicação avançada e pela oportunidade de estar em um outro país aprendendo coisas muito valiosas.

A todos do laboratório de Fisiologia e Cirurgia Cardiorrespiratória, da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto - Portugal e em especial a PATRÍCIA, DANIELA, MARIA JOSÉ, MARTA, SARA, LUCAS, CARLA, GLÓRIA, FRANCISCO, JOÃO, NÁDIA e DULCE. Muito obrigada por toda a colaboração e pela amizade.

Às professoras Dra. PAULA SCHMIDT AZEVEDO GAIOLLA e Dra. BERTHA FURLAN POLEGATO, pelas excelentes sugestões proferidas no exame de qualificação.

Aos meus amigos DIJON, RODRIGO, CAMILA GIMENES e GABRIEL, muito obrigada, sem vocês eu não conseguiria realizar esse trabalho.

A todos os amigos e companheiros do Laboratório Experimental de Clínica Médica: LUANA, MARIANA, CAMILA BONOMO, MARCELO, YASMIM, SARA, FERNANDA, MIRIANE, MARIA TEREZA, ISABELLA, RAQUEL, ALINE, PAULA, DAMIANA, REGIANE, PRISCILA, RICARDO, ADRIANA, PAULINHA, DANI TOMAZ, DANIELA, PAULINHA, BRUNA, ANDRÉA e FABIANE. Obrigada por participarem do dia-a-dia dessa conquista.

A todos os funcionários do Laboratório Experimental de Clínica Médica: JOSÉ CARLOS, CAMILA, ELENIZE, MÁRIO, ROGÉRIO, DE LALLA, ÂNGELO, SUELI CLARA, ELIZETE, VÍTOR, MARTA, FLORIAN, DIEGO, EDUARDO, SILVIA e YGOR. Muito obrigada pelo apoio.

A todos os FUNCIONÁRIOS DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA e da SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, por todo o auxílio disponibilizado.

Aos meus PAIS, pelo apoio e por serem a minha referência. Obrigada por tudo, eu amo vocês!!!

Ao meu marido IVAN, por ser o meu maior incentivador na realização desse trabalho. Por estar presente em todos os momentos, pelos conselhos, pela amizade, pela paciência, pelo amor. Eu agradeço a Deus por ter você em minha vida.

À CAPES e ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

Sumário

Resumo	1
Abstract	4
Introdução	7
Objetivo	13
Material e Métodos	15
Resultados	29
Discussão	40
Conclusão	47
Referências	49

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: diâmetro do átrio esquerdo

AGEs: produtos finais de glicação avançada

ANOVA: análise de variância

AO: diâmetro da aorta

APO: apocinina

AS: área seccional transversa do cardiomiócito

BHT: butilato hidroxitolueno

CaCl₂: cloreto de cálcio

CAH: capacidante antioxidante hidrofílica

CO₂: dióxido de carbono

CTL: grupo controle

DCV: doenças cardiovasculares

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: etídio

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-hidroxietídio

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

Fe²⁺: sulfato ferroso amoniacal

GSH: glutathiona reduzida

GSH-Px: glutathiona peroxidase

GSSG: glutathiona oxidada

HAS: hipertensão arterial sistêmica

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HCl: ácido clorídrico

HOP: hidroxiprolina

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo

ISO: isoproterenol

KCl: cloreto de potássio

KH₂PO₄: fosfato de potássio

Lmax: comprimento máximo

MCD: miocardiopatia diabética

MgSO₄: sulfato de magnésio

MVE: massa do ventrículo esquerdo

NaCl: cloreto de sódio

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NaHCO₃: bicarbonato de sódio

NBT: nitroblue-tetrazólico

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

PP30: pós-pausa de 30 segundos

SHR: ratos espontaneamente hipertensos

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

SOD: superóxido dismutase

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

% Δ endo: porcentagem de encurtamento endocárdico do ventrículo esquerdo

% Δ meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico 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

Resumo

As doenças cardiovasculares (DCV) são a maior causa de invalidez e mortalidade em todo o mundo. Entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento das DCV estão o diabetes mellitus (DM) e a hipertensão arterial sistêmica (HAS). Frequentemente, há co-existência de DM e HAS e isso ocasiona aumento do risco de eventos cardiovasculares. Os danos causados tanto pela HAS como pelo DM têm sido associados com o aumento do estresse oxidativo. A família de enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase constitui uma das principais fontes de produção de espécies reativas de oxigênio no sistema cardiovascular. A apocinina (APO) tem sido caracterizada como um inibidor da NADPH oxidase desde a década de 1980. Apesar de evidências promissoras do uso da APO no tratamento de inúmeras doenças, há estudos questionando seu poder inibidor da NADPH oxidase. Além de controvérsias do uso da APO no bloqueio da NADPH oxidase em células não fagocíticas, poucos estudos avaliaram os efeitos desse bloqueio sobre o remodelamento cardíaco. Além disso, a escassez de informações é maior quando se associa HAS e DM. Portanto, o objetivo foi analisar a influência da inibição da NADPH oxidase por apocinina sobre o remodelamento cardíaco em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com diabetes mellitus. Métodos: SHR, machos, com 7 meses de idade, foram divididos em quatro grupos: controle (CTL, n=18), controle+apocinina (CTL+APO, n=18); diabético (DM, n=20) e diabético+apocinina (DM+APO, n=20). DM foi induzido por estreptozotocina (40 mg/kg, ip, dose única). Os grupos CTL+APO e DM+APO receberam APO (16 mg/kg/dia, diluída na água dos animais) durante 8 semanas. A avaliação estrutural e funcional *in vivo* do coração foi realizada por meio do ecocardiograma. O estudo funcional *in vitro* foi realizado pela técnica do músculo papilar do ventrículo esquerdo (VE). Para análise estrutural *in vitro*, foram medidos os pesos do VE, ventrículo direito e átrios. Amostras dessas estruturas, do fígado e do pulmão foram utilizadas para o cálculo da razão peso úmido/peso seco desses órgãos. Amostras do VE foram obtidas para medir o diâmetro dos miócitos, a área ocupada pelo colágeno e a concentração de hidroxiprolina. A expressão proteica do colágeno tipo I, colágeno tipo III e lisil oxidase foi avaliada por western blotting no VE. O estresse oxidativo foi avaliado pela dosagem da atividade das enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase e capacidade antioxidante hidrofílica (CAH) no plasma e pela dosagem das mesmas enzimas e da concentração de hidroperóxido de lipídio no tecido cardíaco. A quantificação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) no VE foi realizada por imunohistoquímica, e a atividade da NADPH oxidase também no VE foi avaliada por HPLC. Estatística: As comparações foram realizadas por ANOVA – esquema fatorial 2x2 ($p < 0,05$). Resultados: Nos grupos diabéticos, o

ecocardiograma mostrou aumento dos diâmetros do VE e átrio esquerdo, ambos normalizados pelo peso corporal, e aumento no tempo de relaxamento do VE. O estudo do músculo papilar mostrou comprometimento da função contrátil e de relaxamento, nos grupos diabéticos em relação aos seus respectivos controles. Esses efeitos não foram atenuados pela APO. Na condição basal, o grupo CTL+APO mostrou diminuição da tensão desenvolvida, e na manobra de pós-pausa de 30 segundos, a apocinina causou discreta piora da função miocárdica nos grupos CTL+APO e DM+APO. Em relação as variáveis morfométricas, o grupo DM+APO mostrou menor congestão pulmonar em relação ao grupo DM. O grupo DM apresentou maior congestão dos átrios e fígado em relação aos controles, enquanto que o grupo DM+APO não apresentou diferença em relação ao grupo CTL+APO. A avaliação da hipertrofia dos cardiomiócitos não mostrou diferença significativa entre os grupos. Na análise do colágeno miocárdico, os animais do grupo DM apresentaram aumento na concentração de hidroxiprolina, e os animais do grupo DM+APO mostraram aumento na fração de colágeno intersticial em relação aos respectivos controles. A APO não influenciou essas análises do colágeno e hipertrofia cardíaca. Na análise por western blotting, a expressão do colágeno tipo I, lisil oxidase e relação do colágeno tipo I/tipo III não apresentaram diferença significativa entre os grupos. A expressão do colágeno tipo III foi menor nos grupos diabéticos em relação aos respectivos controles. A APO não interferiu nessas variáveis. A avaliação do estresse oxidativo mostrou que a APO aumentou a atividade de algumas enzimas antioxidantes e diminuiu a quantidade de hidroperóxido de lipídio nos animais diabéticos. No entanto, houve diminuição na atividade das enzimas antioxidantes nos animais controles que receberam a APO. A CAH foi menor nos animais diabéticos em relação aos respectivos controles, a APO não influenciou essa variável. A quantificação dos AGEs e a avaliação da atividade da NADPH oxidase não mostraram diferença significativa entre os grupos; a APO não influenciou essas variáveis. Conclusão: A apocinina reduz o estresse oxidativo e não atenua o remodelamento cardíaco causado pelo diabetes mellitus e, provavelmente, não bloqueia a NADPH oxidase em cardiomiócitos. Indícios de prejuízo na função ventricular e miocárdica e na atividade das enzimas antioxidantes, em animais hipertensos sem diabetes, alertam para a cautela no uso dessa substância.

Palavras-chave: diabetes mellitus, hipertensão arterial, remodelamento cardíaco, ratos espontaneamente hipertensos, estresse oxidativo, NADPH oxidase, apocinina.

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) are the major cause of morbidity and mortality worldwide. Diabetes mellitus (DM) and arterial hypertension (AH) are the main risk factors for the development of CVD. The coexistence of diabetes and hypertension is common and leads to an increased risk of cardiovascular events. Organs damage caused by hypertension and DM have been associated with increased oxidative stress. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase enzymes family is a major source of reactive oxygen species in the cardiovascular system. Apocynin (APO) has been characterized as an inhibitor of NADPH oxidase since the 1980's decade. Despite promising evidence of APO in the treatment of many diseases, there are studies questioning its power as an inhibitor of NADPH oxidase. Besides controversies on the use of apocynin in blocking NADPH oxidase in non-phagocytic cells, few studies have evaluated the effects of its blockade on cardiac remodeling. In addition, there is a lack of information when AH and DM are associated. Therefore, the aim was to analyze the influence of NADPH oxidase inhibition by apocynin on cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats (SHR) with diabetes mellitus. Methods: Seven-month-old male SHR were divided into four groups: control (CTL, n=18); CTL+APO (n=18); DM (n=20); DM+APO (n=20). DM was induced by streptozotocin (40 mg/kg, i.p., single dose). CTL+APO and DM+APO groups received APO (16 mg/kg/day, diluted in the water) for 8 weeks. *In vivo* cardiac structures and functions were assessed by echocardiogram. *In vitro* functional study was performed by left ventricular papillary muscle study. *In vitro* left ventricle (LV), right ventricle and atria weights were measured. Samples of these structures, liver and lung were used to calculate the wet/dry weight ratio. LV tissue samples were obtained to measure myocyte diameters, interstitial collagen fraction, and hydroxyproline concentration. Left ventricular types I and III collagen and lysyl oxidase protein expressions were evaluated by western blotting. Oxidative stress was evaluated by measuring the activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and hydrophilic antioxidant capacity (HAC) in plasm, and the same enzymes and lipid hydroperoxide concentration in LV tissue. Quantification of the advanced glycation end products (AGEs) in LV was performed by immunohistochemistry, and NADPH oxidase activity was assessed by HPLC. Statistics: Comparisons were performed by ANOVA - 2x2 factorial ($p<0.05$). Results: In diabetic groups, echocardiogram showed increased LV and left atrium diameters indexed for body weight, and increased LV relaxation time. Papillary muscle study

showed impaired contractile function and relaxation in diabetic groups compared to their respective controls. These effects were not attenuated by APO. At baseline, the CTL+APO group showed decreased developed tension, and at postrest contraction of 30 seconds maneuver, apocynin caused mild worsening of myocardial function in CTL+APO and DM+APO groups. Morphometric analyses showed lower pulmonary congestion in DM+APO compared to DM group. DM group showed greater atria and liver congestion than control, while DM+APO showed no difference compared to CTL+APO group. Cardiomyocyte diameters were not different between groups. Myocardial collagen analyses showed increased hydroxyproline concentration in DM group, and DM+APO group showed increased interstitial collagen fraction when compared to their respective controls. Results of collagen and cardiac hypertrophy analyses were not affected by APO. Protein expressions of type I collagen, lysyl oxidase, and type I/III collagen ratio were not different between groups. Type III collagen expression was lower in diabetic groups compared to their respective controls. APO did not interfere in these variables. Assessment of oxidative stress showed that APO increased antioxidant activity of some enzymes and decreased the amount of lipid hydroperoxide in diabetic animals. However, APO decreased the activity of antioxidant enzymes in control animals. The HAC was lower in diabetic animals compared to their respective controls; the APO did not influence this variable. Quantification of AGEs and assessment of NADPH oxidase activity showed no significant difference between the groups; APO did not influence these variables. Conclusion: apocynin reduces oxidative stress and does not attenuate cardiac remodeling caused by diabetes mellitus, and probably does not block the NADPH oxidase in cardiomyocytes. Some evidence of impaired ventricular and myocardial function and activity of antioxidant enzymes in nondiabetic hypertensive animals, alert to caution in using this substance.

Key-words: diabetes mellitus, arterial hypertension, cardiac remodeling, spontaneously hypertensive rats, oxidative stress, NADPH oxidase, apocynin.

Introdução

As doenças cardiovasculares (DCV) são a maior causa de invalidez e mortalidade em todo o mundo (Pagidipati & Gazino, 2013). Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se para 2030 que mais de 23 milhões de pessoas morrerão por DCV (Laslett et al., 2012). Portanto, as DCV são motivos de preocupação da comunidade médica e de autoridades governamentais. Além disso, acomete indivíduos adultos jovens na idade produtiva, causando invalidez parcial ou total, e com graves consequências para o indivíduo, os familiares e a sociedade.

A prevalência dos fatores de risco para o desenvolvimento das DCV está aumentando em ritmo alarmante. Entre os principais fatores estão o diabetes mellitus (DM) e a hipertensão arterial sistêmica (HAS) que causam aumento da morbidade e mortalidade (Sowers & Epstein, 1995; Alderman et al., 1999; Go et al., 2013).

Define-se HAS como uma síndrome caracterizada pela presença de níveis tensionais elevados nas artérias, associados a alterações metabólicas, hormonais e fenômenos tróficos (hipertrofias cardíaca e vascular) (Lotufo, 2009; Sociedade Brasileira de Hipertensão, 2010). Dados da Organização Mundial da Saúde mostram que a HAS é um importante problema de saúde pública e que devido as suas complicações é responsável por cerca de 9,4 milhões de mortes por ano no mundo (World Health Organization, 2013).

Para o estudo experimental da HAS, frequentemente é utilizada a linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), desenvolvidos por Okamoto e Aoki (1963), por meio de reprodução genética, que resultou em animais naturalmente hipertensos (Okamoto et al., 1966). Esse modelo experimental de HAS é similar, em muitos aspectos à hipertensão primária do homem (Trippodo & Frohlich, 1981). Precocemente, os animais desenvolvem elevação da pressão arterial e hipertrofia do ventrículo esquerdo do tipo concêntrica (Trippodo & Frohlich, 1981; Anversa et al., 1984). O crescimento da massa ventricular permite a manutenção da função sistólica normal, apesar da elevada pressão arterial.

O DM é uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada por hiperglicemia crônica, a qual acarreta distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, resultantes de defeitos na secreção e/ou ação da insulina (Alberti & Zimmet, 1998). A prevalência de DM é elevada na população mundial e estima-se que até 2030 haverá aumento de 69% no número de adultos com DM em países em desenvolvimento e de 20% em países desenvolvidos (Shaw et al., 2010).

Além de ser responsável por danos em múltiplos órgãos (nervos, rins e olhos), o DM é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose coronariana, bem como causa da doença miocárdica não aterogênica, a miocardiopatia diabética (MCD).

A MCD é originada como resultado de complexas relações entre anormalidades metabólicas que acompanham o diabetes e suas consequências celulares, levando à alteração da estrutura e função miocárdica (Boudina & Abel, 2007; Miki et al., 2013). Entre as alterações celulares está a perda anormal de cardiomiócitos por apoptose, causada principalmente pelo estresse oxidativo que ocorre no DM (González et al., 2003; Khavandi et al., 2009; Fiorentino et al., 2013).

Frequentemente, há co-existência de DM e HAS e isso ocasiona aumento do risco de eventos cardiovasculares (Mancia, 2005; Matheus et al., 2013). A HAS agrava as complicações cardiovasculares associadas ao DM e vice-versa. A co-existência dessas duas desordens resulta em maiores danos estruturais e funcionais cardíacos que aqueles causados por apenas uma delas, e pode resultar em insuficiência cardíaca congestiva prematura, morte súbita e infarto agudo do miocárdio (Grossman & Rosenthal, 1995; Sowers & Epstein, 1995; Factor et al., 1996; Alderman et al., 1999).

A HAS tem sido apontada como um importante fator de risco para o desenvolvimento de DM, pois indivíduos com pressão arterial elevada têm de 2 a 3 vezes mais chance de desenvolver diabetes do que aqueles com pressão arterial normal (Grossman & Messerli, 2008; Williams, 2013).

Os danos causados tanto pela HAS como pelo DM têm sido associados com o aumento do estresse oxidativo (Paravicini & Touyz, 2008; Briones & Touyz, 2010; Yang et al., 2011).

O termo estresse oxidativo refere-se ao desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as defesas antioxidantes, além de disfunção das enzimas envolvidas na produção das EROs (Sies, 1997; Maraldi et al., 2013).

Em condições fisiológicas as EROs atuam como sinalizadores celulares, porém em excesso causam diversos danos ao organismo. Elas são capazes de induzir oxidação e danos às macromoléculas, membranas e DNA, e assim contribuir para o dano celular e aceleração da morte celular através de apoptose e necrose (Cave et al., 2005; Rodiño-Janeiro et al., 2013).

No diabetes, a hiperglicemia, hiperlipidemia e inflamação, por estimular a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, causam a maior parte de suas complicações (Pappachan et al., 2013). A hiperglicemia é um importante fator responsável pelos danos oxidativos por meio dos seguintes mecanismos: aumento do fluxo pela via dos polióis, ativação de isoformas de proteína quinase C, aumento do fluxo da via de hexosaminas e formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs, do inglês advanced glycation end products) (Laakso, 2011; Fiorentino et al., 2013). AGEs são formados através da glicação não enzimática de proteínas e lípidos e auto-oxidação da glicose, desse modo alterando a estrutura e função tecidual (Giacco & Brownlee, 2010). A produção de AGEs é uma das principais vias de danos oxidativos causados pelo DM, e evidências sugerem que AGEs estão envolvidos em diversos meios de geração de estresse oxidativo, inclusive aumentam a geração de EROs pela NADPH oxidase em células endoteliais humanas (Toma et al., 2009).

As EROs podem ser geradas por diferentes fontes, tais como, cadeia de transporte de elétron mitocondrial, xantina oxidase, mieloperoxidase, e lipoxigenase (Paletta-Silva et al., 2013), no entanto, a família de enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase com suas subunidades catalíticas (NOX) constitui uma das principais fontes de produção de EROs no sistema cardiovascular (Murdoch et al., 2006; Rodiño-Janeiro et al., 2013; Altenhofer et al. 2014). As NADPH oxidases são enzimas transmembrana que produzem superóxido pela transferência de um elétron da NAD(P)H para o oxigênio molecular. Sete membros da NOX foram identificados em diversos órgãos e tecidos. Nos cardiomiócitos, são expressas a NOX 2 e, principalmente, a NOX 4, que são as subunidades principais, ligadas à subunidade p22phox (Akki et al, 2009; Kuroda & Sadoshima, 2010; Altenhofer et al. 2014). A NOX 2, para se tornar ativa, precisa se ligar a subunidades citosólicas, como p67phox, p47 phox e outras, que se deslocam até a membrana. Já a NOX 4 é constitutivamente ativa, ou seja, não precisa se ligar a estas subunidades citosólicas (Akki et al, 2009; Kuroda & Sadoshima, 2010; Altenhofer et al. 2014).

O aumento da atividade da NADPH oxidase resulta na formação de radicais livres com consequente diminuição de antioxidantes celulares tais como a glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase (Dias & Griffiths, 2014).

O complexo tipo fagocítico NADPH oxidase é uma importante fonte produtora de EROs na vasculatura e está implicado na fisiopatologia da hipertensão

e aterosclerose. Estudos em modelos experimentais de doenças cardíacas têm sugerido papel importante da NADPH oxidase no miocárdio (Heymes et al., 2003; Teshima et al., 2014). Há relatos de aumento na expressão e atividade da NADPH oxidase no miocárdio em modelos experimentais de sobrecarga pressórica e hipertrofia cardíaca (Li et al., 2002). Portanto, evidências sugerem papel de destaque das EROs, derivadas da NADPH oxidase, na gênese da disfunção contrátil do miocárdio (MacCarthy et al., 2001; Rodiño-Janeiro et al., 2013). Em 2003, um estudo forneceu os primeiros dados do aumento da atividade e expressão da NADPH oxidase no miocárdio de humanos com insuficiência cardíaca crônica (Heymes et al., 2003).

No cenário do DM também há relatos de que a glicose induz alterações na atividade da NADPH oxidase (Ding et al., 2007; Teshima et al., 2014). Visto que esse complexo enzimático desempenha importante papel em diversas patologias, tem havido grande interesse no bloqueio de sua atividade, pois, o desenvolvimento de inibidores específicos pode fornecer ferramentas para desvendar o papel da NADPH oxidase e contribuir para o tratamento de inúmeras doenças (Rabêlo et al., 2010; Rodiño-Janeiro et al., 2013).

A apocinina, isolada da planta medicinal *Picrorhiza kurroa* (Stolk et al., 1994), além de suas múltiplas ações biológicas e antioxidantes, tem sido caracterizada como um inibidor da NADPH oxidase desde a década de 1980 (Simons et al., 1990). Grande número de estudos disponíveis na literatura tem utilizado a apocinina para tal finalidade (Rabêlo et al., 2010; Kinkade et al., 2013). O papel da apocinina é impedir a liberação do ânion superóxido pela NADPH oxidase, através do bloqueio da montagem funcional do complexo enzimático, inibindo a migração do p47phox para a membrana (Touyz, 2008).

Os efeitos benéficos do uso do inibidor da NADPH oxidase, apocinina, têm sido notados. Rugale et al. (2005) demonstraram que o uso da apocinina reduziu a produção do ânion superóxido e os produtos avançados de oxidação proteica, induzidos pela angiotensina II, no ventrículo esquerdo de ratos. Pechánová et al. (2009) demonstraram que a apocinina foi capaz de diminuir a produção de EROs em ratos hipertensos. Em ratos alimentados com frutose, a apocinina melhorou a função endotelial e o desenvolvimento de hipertensão arterial (Unger & Patil, 2009).

Em modelos de diabetes, a apocinina diminuiu a expressão da NADPH oxidase na aorta de ratos diabéticos e restaurou a função endotelial e a síntese de óxido nítrico (Olukman et al., 2010). O tratamento com apocinina atenuou a neuropatia diabética em um estudo experimental com ratos (Zhao et al., 2014). Além disso, a apocinina melhorou a função renal no modelo de nefropatia induzida por DM em ratos (Gill & Wilcox, 2006). Por fim, evidências sugerem que o uso do inibidor da NADPH oxidase pode ser considerado importante alvo para o tratamento da miocardiopatia diabética (Privratsky et al., 2003; Zhou et al., 2008; Li et al., 2010; Rodiño-Janeiro et al., 2013). Roe et al. (2011) em estudo com camundongos diabéticos relataram melhora da função cardíaca pela apocinina.

Poucos estudos utilizaram a apocinina no modelo experimental associando HAS e DM. Dhaunsi et al. (2010) verificaram que a apocinina atenuou a elevação da atividade da NADPH oxidase no rim de SHR com diabetes, reduziu a proteinúria e a hiperglicemia, e teve pequeno efeito na redução da pressão arterial média.

Apesar de evidências promissoras do uso da apocinina no tratamento de inúmeras doenças, há estudos questionando seu poder inibidor da NADPH oxidase. Alguns relatam a apocinina apenas como antioxidante e não como bloqueadora da atividade da NADPH oxidase em células não fagocíticas (Heumüller et al., 2008; Touyz, 2008), outros estudos apontam uma atividade pró-oxidante da apocinina nesses tipos celulares (Vejrazka et al., 2004, Riganti et al., 2006, Castor et al., 2010).

Desse modo, além das controvérsias do uso da apocinina no bloqueio da NADPH oxidase em células não fagocíticas, poucos estudos avaliaram os efeitos desse bloqueio sobre o remodelamento cardíaco. Além disso, a escassez de informações é maior quando se associa HAS e DM.

Objetivo

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

Material e Métodos

Animais e Constituição dos Grupos

Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR), machos, com 7 meses de idade, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório – CEMIB, da Universidade de Campinas - UNICAMP. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Protocolo CEEA 863-2011).

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

- Controle (CTL, n=18): SHR que receberam ração comercial e água *ad libitum*;
- Controle + apocinina (CTL+APO, n=18): SHR que receberam ração comercial e água *ad libitum* com apocinina;
- Diabético (DM, n=20): SHR diabéticos que receberam ração comercial e água *ad libitum*;
- Diabético + apocinina (DM+APO, n=20): SHR diabéticos que receberam ração comercial e água *ad libitum* com apocinina.

A distribuição dos animais entre os grupos foi realizada de acordo com o peso corpóreo e pressão arterial de modo que as médias entre os grupos fossem similares, embora os animais não diferissem significativamente. Também foi realizado exame ecocardiográfico em ambos os grupos, antes da indução do diabetes, para assegurar que, além da pressão arterial elevada, os animais também apresentassem uniformidade quanto à estrutura e função cardíaca.

A indução de DM foi realizada por meio da administração intraperitoneal de estreptozotocina (Sigma, St. Louis, MO, USA), em dose única, na concentração de 40 mg/kg de peso corporal, diluída em tampão citrato 0,1M pH 4,5 (Fernandes et al., 2010). Os animais controles receberam apenas a solução tampão. Sete dias após a administração de estreptozotocina ou tampão (Bugger & Abel, 2009), amostras de sangue foram retiradas por punção da cauda, e a glicemia foi determinada através de um glicosímetro (*Advantage®*). Os animais que apresentaram concentração de glicose sérica acima de 220 mg/dL foram considerados diabéticos (Babu & Srinivasan, 1999). A glicemia dos animais foi medida no início e no final do período experimental.

Sete dias após a injeção de estreptozotocina, e confirmado o estado diabético, os ratos pertencentes aos grupos CTL+APO e DM+APO receberam,

diariamente, apocinina (Sigma, St. Louis, MO, USA), na concentração de 16 mg/kg/dia diluída na água dos animais, durante todo o período experimental que foi de 8 semanas (Gimenes et al., 2012; Lu et al., 2013). O consumo de água foi medido diariamente, além disso, os animais foram pesados semanalmente em balança digital (Mettler® modelo Spider 2).

Os animais foram alojados em gaiolas individuais, sendo mantidos em ambiente com temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (ciclos 12/12 horas claro/escuro) controlados.

Aferição da Pressão Arterial

A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida na cauda do animal, em dois momentos: 1) antes da administração de estreptozotocina ou somente solução tampão; e 2) ao final do período experimental. Para aferição da pressão arterial sistólica foi utilizado o método 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 um transdutor de pressão (*Gould*, OH, USA). O manguito foi insuflado até atingir pressão de 200 mmHg e, posteriormente, desinsuflado. As pulsações arteriais foram registradas em sistema de aquisição de dados computadorizado (*AcqKnowledge*® MP100, Biopac Systems Inc., Santa Barbara, CA, USA).

Estudo Ecocardiográfico

O ecocardiograma foi realizado no início e 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 Vivid S6 (*General Electric Medical Systems*, Israel) equipado com transdutor multifrequencial de 5,0-11,5 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 modelo UP-895 (Sony Co., 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 e sistólicas da parede posterior do VE (EDPP e ESPP) e do septo interventricular (EDSIV e ESSIV); diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A espessura relativa do VE (ERVE) foi calculada dividindo-se a EDPP multiplicada por dois pelo DDVE. A massa do VE (MVE) foi calculada pela fórmula $[(DDVE+EDPP+EDSIV)^3-(DDVE)^3] \times 1,04$, onde 1,04 representa a densidade específica do miocárdio (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) $[(DDVE-DSVE)/DDVE] \times 100$; 2) porcentagem de encurtamento mesocárdico (% Δ meso) $\{[(DDVE+\frac{1}{2}EDPP+\frac{1}{2}EDSIV)-(DSVE+\frac{1}{2}ESPP+\frac{1}{2}ESSIV)]/(DDVE+\frac{1}{2}EDPP+\frac{1}{2}EDSIV)\} \times 100$; 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 ($TRIV_n = TRIV/R-R^{0.5}$). 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; Okoshi et al., 2006; Gut et al., 2008). 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 (O₂) e 5% de dióxido de carbono (CO₂). 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).

Após dissecação do ventrículo direito e corte no septo interventricular, o VE foi dividido em duas partes, cada uma contendo o seu músculo papilar e, em seguida, dissecados numa placa de vidro contendo solução descrita acima. 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 O₂ e 5% de CO₂ 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 L_{max} . Após atingir L_{max} , 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 L_{max} . 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, mm^2). O comprimento (L_{max}) 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 L_{max} , 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 1,25 mM, deixando o músculo se estabilizar por 10 minutos; a seguir, foi realizada elevação de cálcio para 2,50

mM. 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 de Variáveis Anatômicas

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. 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.

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 μm 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 40X, 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, foram medidos os menores diâmetros transversos de, no mínimo, 50 fibras cardíacas nas quais o núcleo foi 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.

Quantificação de Hidroxiprolina

A hidroxiprolina é um aminoácido presente predominantemente 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 (Matsubara et al., 2000; Epifanio et al., 2005).

Inicialmente foram obtidas as soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina (diluição 60 µl HOP/2940 µl HCl) e a solução branca (água destilada). Previamente à execução do processamento bioquímico, foi necessária a preparação dos seguintes reagentes químicos: tampão borato 0,2 M (pH 8,7), tiosulfato de sódio 3,6 M e o reagente de Ehrlich. O processamento bioquímico para determinação da concentração de hidroxiprolina foi iniciado por secagem das soluções-padrão e das amostras no concentrador de amostras (*Speed Vac*). A hidrólise ácida foi realizada mediante adição de HCl 6 N em cada um dos tubos das amostras, que foram aquecidas em estufa a 100° C por 8 horas. A oxidação foi realizada após retirada e resfriamento dos tubos da estufa. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 6.800 g por 10 minutos e colocadas novamente no concentrador de amostras (*Speed Vac*) por 3 horas. Retirada as amostras, adicionou-se 1 mL de água destilada e tamponada com solução tampão borato 0,2 M pH 8,7; após 20 minutos, a reação foi inibida com solução tiosulfato 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 adicionados 2,5 mL de tolueno e agitados por 5 minutos para separação das fases água e tolueno. Retirou-se 1,5 mL de tolueno da solução, que foi colocado em tubos de hemólise e acrescentado 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.

Western Blotting

A expressão proteica dos colágenos tipo I (*Santa Cruz Biotechnology*, Santa Cruz, CA, USA) e tipo III e da lisil oxidase (*Abcam*, Cambridge, UK) foram avaliadas por Western blot.

Resumidamente, fragmento do miocárdio do VE (80-100 mg) foi homogeneizado com 800 µL de tampão Tris-Triton, contendo inibidores de protease e fosfatase. A seguir, o homogenato foi centrifugado por 20 minutos a 15.000 g, a 4° C, para eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi coletado e separado em alíquotas, as quais foram armazenadas a -80° C. Uma das alíquotas foi utilizada para quantificação de proteína pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Para cada proteína alvo, foi realizada eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida a 4° C (30 minutos a 50 V e 2 horas a 120 V). Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema de transferência úmida por 90 minutos a 120 V, a 4° C. A seguir, a membrana foi incubada em solução de leite desnatado 5% em temperatura ambiente por 2 horas (bloqueio) para prevenir ligações inespecíficas com os anticorpos primário e secundário. Posteriormente, a membrana foi lavada com TBST (tampão contendo Tris, NaCl e Tween 20) e incubada durante a noite, a 4° C, com anticorpo primário específico para cada proteína. No dia subsequente, a membrana foi lavada com TBST e incubada à temperatura ambiente por 90 minutos com anticorpo secundário (conjugado a peroxidase) adequado para ligação com o anticorpo primário utilizado, de acordo com recomendação do fabricante. Os sinais foram visualizados com auxílio de *kit* para quimioluminescência (ECL Western Blotting Substrate, Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) e analisador de imagens (Gel Logic 6000, Carestream Health Inc., Carestream Molecular Imaging, Woodbridge, USA).

Após obtenção das imagens das bandas referentes à proteína alvo, a membrana foi incubada com *Restore Western Blot Stripping Buffer* (Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) para remoção dos anticorpos ligados à membrana. A seguir, foi realizado novamente o processo de bloqueio e a membrana foi incubada durante a noite, a 4° C, com anticorpo primário para a proteína

constitutiva GAPDH. O procedimento prosseguiu da mesma forma como descrito anteriormente até a detecção do sinal.

Os resultados obtidos para as proteínas alvo foram normalizados pelos resultados da proteína constitutiva GAPDH.

- Anticorpos primários da *Santa Cruz Biotechnology Inc.* (California, USA): col1a1 (sc-8784-r) e GAPDH (sc-32233).
- Anticorpos primários da *Abcam* (Cambridge, UK): col3a1 (ab6310) e LOX1 (ab60178).
- Anticorpos secundários da *Santa Cruz Biotechnology Inc.* (California, USA): anti-mouse (sc-2005) e anti-rabbit (sc-2004).

Obtenção das Amostras para Avaliação do Estresse Oxidativo

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 plasma foi separado por centrifugação a 3.000 g, a 4° C, por 15 minutos, e foi utilizado para determinação da atividade da glutathione peroxidase, superóxido dismutase, catalase e da capacidade antioxidante hidrofílica. Após a obtenção do sangue e a retirada dos músculos papilares, o coração foi imediatamente isolado e amostras do ventrículo esquerdo (aproximadamente de 200 mg) foram estocadas à -80° C. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,1 M) pH 7,4 e o homogeneizado centrifugado a 12.000 g, durante 15 minutos a 4° C (Pereira et al., 1998). O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de hidroperóxido de lipídio (atividade pró-oxidante) e atividade da glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase.

Avaliação do Estresse Oxidativo

Determinação de Hidroperóxido de Lipídio

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

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

Determinação da Atividade de Glutathione Peroxidase (GSH-Px)

A atividade da glutathione peroxidase foi determinada segundo método de Nakamura et al. (1974), na presença de peróxido de hidrogênio. A mistura de reação foi preparada com tampão fosfato de sódio, NADPH₂, azida sódica, EDTA, glutathione reduzida (GSH) e glutathione redutase. Através da oxidação do NADPH₂ a 340 nm na presença da glutathione redutase, a qual catalisa a redução da glutathione oxidada (GSSG), determinou-se a atividade da GSH-Px.

Determinação da Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela técnica de Crouch et al. (1981), tendo como base a capacidade da enzima de inibir a redução do nitroblue-tetrazólico (NBT) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino (pH 10,0). 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, conforme a porcentagem de SOD presente na amostra.

Determinação da Atividade da Catalase

A atividade da catalase foi determinada em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, contendo 10 mM de peróxido de hidrogênio, completando o volume final de 0,3 mL para cada amostra. A unidade para catalase foi definida como sendo a quantidade da enzima capaz de degradar 1 µmol H₂O₂ durante 60 segundos, a 240 nm (AEBI, 1974).

Medida da Capacidade Antioxidante Hidrofílica

A medida da capacidade antioxidante hidrofílica foi determinada fluorometricamente, conforme descrita por Beretta e colaboradores (2006) utilizando leitor VICTOR X2 (Perkin Elmer, Boston, MA). A capacidade antioxidante foi

quantificada por meio de comparação da área sobre a curva relativa à cinética de oxidação da suspensão fosfatidilcolina (PC), o qual foi usado como referência de matriz biológica. O 2',2 Azobis (2- amino-propano)- dihidroclorado (AAPH) foi usado como iniciador de radical peroxil. Os resultados representam a porcentagem de inibição do (4,4-difluoro-5-(4-fenil 1-3 butadienil)-4-bora-3^a,4^a-diazas-indaceno-3-ácidoundecanóico (BODIPY) 581/591 no plasma com relação ao que ocorreu na amostra controle do BODIPY 581/591 em lipossoma PC. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados são apresentados em porcentagem de proteção.

Quantificação dos Produtos Finais de Glicação Avançada

A análise imunohistoquímica foi realizada em tecido miocárdico incluído em blocos de parafina. Após o corte dos blocos em micrótomo, os tecidos foram montados em lâminas para imunohistoquímica. A seguir foi realizada a desparafinização e recuperação antigênica com EDTA. Foram realizados bloqueios com hidróperóxido de hidrogênio, soro de cabra e avidina/biotina. Os cortes de tecido foram incubados com anticorpo primário (rabbit polyclonal to AGE - 200ug; ref. Ab23722, Abcam) por 1 hora e, em seguida, com anticorpo secundário (goat polyclonal secondary antibody to rabbit IgG HL – Biotin; ref. Ab6720, Abcam) por 2 horas, ambos em temperatura ambiente, e com estreptavidina por 15 minutos. Os cortes foram corados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB), contracolorados com hematoxilina, desidratados e cobertos com lâminula (van Heerebeek et al., 2012). A análise foi realizada utilizando-se uma câmara de vídeo acoplada a um microscópio, com objetiva 40X, conectado a computador equipado com um programa analisador de imagem (*Image-Pro Plus 6.0 Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA*). Retidas as imagens, os componentes do tecido cardíaco foram identificados segundo o realce de cor. Os produtos finais de glicação avançada refletem a cor marrom, enquanto os miócitos são vistos na cor lilás. Áreas contendo vasos sanguíneos foram excluídas da análise.

As análises descritas nesta seção foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Prof. Catedrático Dr. Adelino Leite Moreira, do Departamento de Fisiologia e Cirurgia Cardiorrástica, da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto - Portugal, sob orientação da pesquisadora Prof^a. Dr^a. Inês Falcão Pires.

Avaliação da Atividade da NADPH Oxidase em Frações de Membrana Celular

A atividade da NADPH oxidase foi avaliada em frações enriquecidas de membrana celular pela quantificação dos compostos fluorescentes 2-hidroxietídio (EOH) e etídio (E) derivados da oxidação do dihidroetídio (DHE), detectada por meio de HPLC (Fernandes et al., 2007; Laurindo et al., 2008). O EOH é gerado especificamente pela oxidação do DHE pela ação do ânion superóxido (Zhao et al., 2003), enquanto a formação de etídio está associada, principalmente, a vias envolvendo peróxido de hidrogênio e sistemas oxidativos baseados em metais, como hemoproteínas e peroxidases (Fink 2004; Papapostolou et al., 2004).

O tecido miocárdico foi lavado em PBS para remoção de coágulos sanguíneos e trombos. Fragmentos de músculo (aproximadamente 200 mg) foram homogeneizados com o auxílio de um Polytron, em gelo, com 1 mL de tampão lise contendo Tris 50 mM (pH 7,4), DTPA 100 mM, β -mercaptoetanol 0,1% e inibidores de protease. A seguir, as amostras foram submetidas a sonicação (3 ciclos de 10 s a 8 Watts) e centrifugação a 1.000 g, por 3 min, a 4° C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e centrifugado a 18.000 g, por 10 min, a 4° C. Novamente, o sobrenadante foi transferido para tubo de ultra-centrífuga e submetido a centrifugação a 100.000 g, por 45 min a 4° C. A seguir o sobrenadante foi desprezado e o precipitado (*pellet*) ressuspensão em 100 μ L de tampão de lise, obtendo-se, assim, a fração enriquecida de membrana (Laurindo et al., 2008). A quantificação de proteínas totais foi realizada, então pelo método de Bradford (Bradford 1976).

Posteriormente, foram incubados 20 μ g de fração enriquecida de membrana em 100 μ L de solução tampão fosfato (50 mM, pH 7,4, com DTPA 0,1 mM) contendo DHE (50 μ M) e NADPH (300 μ M), por 30 min, a 37° C em banho-maria e protegido da luz. Após adição de 40 μ L de ácido tricloroacético 10%, as amostras foram mantidas em gelo, protegidas da luz, por 10 min. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 10 min, a 4° C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e analisado em HPLC para quantificação de produtos de fluorescência derivados do DHE, de acordo com o método previamente descrito por Laurindo e colaboradores (Fernandes et al., 2007; Laurindo et al., 2008). A quantificação dos compostos foi realizada por comparação das integrais das áreas

dos picos correspondentes com as integrais obtidas com padrões autênticos submetidos às mesmas condições cromatográficas.

As análises descritas nesta seção foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Prof. Adjunto Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo, do Departamento de Cardio-Pneumologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob orientação da pesquisadora Dra. Denise de Castro Fernandes.

Análise Estatística

Os dados numéricos são expostos como média $\pm$ desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75% de acordo com a distribuição normal ou não normal. Para as comparações entre os grupos foi utilizada a técnica da análise de variância (ANOVA) complementados por cálculos ou testes recomendados para o esquema fatorial 2 X 2, de acordo com a distribuição probabilística (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% ($p < 0,05$).

Resultados

O estudo foi iniciado com 76 animais, divididos nos grupos CTL (n=18), CTL+APO (n=18), DM (n=20) e DM+APO (n=20). Porém, nesse modelo experimental de DM, alguns animais podem não atingir o nível de glicemia acima de 220 mg/dL. Isso ocorreu com 6 animais do grupo DM e 5 animais do grupo DM+APO, os 11 animais foram descartados do estudo. Não ocorreram óbitos durante o período de seguimento em nenhum dos grupos do estudo.

Foram tomados os devidos cuidados para que os animais recebessem a quantidade correta da apocinina e não ficassem privados de água. Habitualmente, no nosso laboratório, o consumo de água dos animais diabéticos tem sido de $117 \pm 10,0$ mL por rato, e o consumo dos animais sem diabetes de $55,1 \pm 4,8$ mL (Rosa, 2011).

Glicemia

A dosagem da glicemia foi realizada antes e após a indução do DM e antes da eutanásia dos animais. Antes da indução do DM não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Após a indução do DM e antes da eutanásia dos animais, os grupos DM e DM+APO apresentaram aumento significativo da glicemia em relação aos respectivos controles. A apocinina não influenciou os valores da glicemia (Tabela 1).

Tabela 1. Glicemia dos animais

Variáveis	CTL (n=18)	CTL+APO (n=18)	DM (n=14)	DM+APO (n=15)
Antes da indução DM (mg/dL)	90,0(83,2-101)	93,0(83,0-99,8)	91,0(90,0-99,8)	94,0(90,0-99,0)
Após a indução do DM (mg/dL)	90,0(87,0-94,0)	91,0(86,0-100)	473(392-493)*	513(428-598) [#]
Antes da eutanásia (mg/dL)	92,5(88,0-101)	94,0(88,0-107)	600(542-600)*	600(538-600) [#]

Valores expressos em mediana e percentis 25% e 75%. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle e apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético e apocinina. *: $p < 0,05$ vs. CTL; [#]: $p < 0,05$ vs. CTL+APO (ANOVA + esquema fatorial 2x2).

Peso Corporal (PC)

Pode-se observar na Tabela 2 que não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao PC inicial entre os grupos. No entanto, ao final do estudo os grupos diabéticos apresentaram peso menor em relação aos seus respectivos controles. Não houve interferência da apocinina nessa variável.

Tabela 2. Peso corporal dos animais

Variáveis	CTL (n=18)	CTL+APO (n=18)	DM (n=14)	DM+APO (n=15)
PC Inicial (g)	360±27,0	361±28,4	356±16,1	359±18,1
PC Final (g)	362±25,1	364±27,3	254±36,1*	239±36,9 [#]

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; PC: peso corporal. *: p<0,05 vs. CTL; [#]: p <0,05 vs. CTL+APO (ANOVA + esquema fatorial 2x2).

Pressão Arterial Sistólica

Nos momentos inicial e final os grupos apresentaram valores semelhantes de pressão arterial sistólica (Tabela 3). A apocinina não causou alterações nesta variável.

Tabela 3. Pressão arterial sistólica no início e no final do experimento

Variáveis	CTL (n=18)	CTL+APO (n=18)	DM (n=14)	DM+APO (n=15)
PAS Inicial (mmHg)	189±18,7	189±18,0	191±18,4	190±17,3
PAS Final (mmHg)	184±21,5	186±21,1	187±28,4	184±24,5

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; PAS: pressão arterial sistólica. ANOVA + esquema fatorial 2x2.

Avaliação Ecocardiográfica

As variáveis estruturais cardíacas obtidas por ecocardiograma estão expostas na Tabela 4. A FC, DDVE, EDPP e MVE foram menores no grupo DM+APO em relação ao grupo CTL+APO. Os diâmetros da AO e AE apresentaram-

se menores e o DDVE e AE normalizados pelo PC apresentaram-se maiores nos grupos diabéticos em relação aos seus respectivos controles. O IMVE foi maior no grupo DM em relação ao controle. A apocinina não interferiu nessas variáveis.

Tabela 4. Variáveis estruturais do coração obtidas por ecocardiograma ao final do período experimental

Variáveis	CTL (n=16)	CTL+APO (n=16)	DM (n=13)	DM+APO (n=14)
PC	381±29,9	374±25,5	274±40,5*	260±32,6 [#]
FC	269±48,3	287±45,0	255±38,5	249±35,9 [#]
DDVE	7,26(6,95-7,78)	7,56(7,14-7,91)	6,87(6,69-7,39)	6,82(6,33-7,07) [#]
EDPP	1,69±0,17	1,71±0,19	1,63±0,17	1,55±0,16 [#]
AO	4,45(4,20-4,75)	4,40(4,30-4,75)	4,20(3,80-4,40)*	4,05(3,80-4,20) [#]
AE	6,57±0,84	6,45±0,55	5,54±0,84*	5,43±0,72 [#]
AE/AO	1,45±0,15	1,43±0,15	1,34±0,19	1,32±0,15
DDVE/PC	19,5±1,87	20,4±2,27	26,2±5,04*	26,6±4,71 [#]
AE/PC	17,3±2,06	17,3±2,14	20,5±3,97*	21,1±3,23 [#]
MVE	0,89±0,16	0,95±0,21	0,78±0,13	0,70±0,14 [#]
IMVE	2,34±0,37	2,54±0,57	2,89±0,64*	2,70±0,59
ERVE	0,46±0,06	0,45±0,07	0,47±0,07	0,46±0,07

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; PC: peso corporal (kg); FC: frequência cardíaca (bpm); DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE) (mm); EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE (mm); AO: diâmetro da aorta (mm); AE: diâmetro do átrio esquerdo (mm); MVE: massa do VE (g); IMVE: índice de massa do VE (g/kg); ERVE: espessura relativa do VE. *: p<0,05 vs. CTL; #: p<0,05 vs. CTL+APO (ANOVA + esquema fatorial 2x2).

A Tabela 5 apresenta as variáveis funcionais do ventrículo esquerdo. A função sistólica do VE não se mostrou diferente no grupo DM em relação ao CTL (%Δ endo, %Δ meso, VEPP e S média). No grupo DM+APO, a VEPP foi menor em relação ao CTL+APO. A VEPP também foi menor no grupo DM em relação ao CTL, no entanto, não atingiu significância estatística. Em relação a função diastólica do VE, os valores de TRIV e TRIVn foram maiores nos grupos diabéticos em relação aos seus respectivos controles. No grupo DM, a onda E e E' média foram menores em relação ao grupo CTL, e no grupo DM+APO não houve diferença em relação ao CTL+APO e também em relação ao grupo DM.

Tabela 5. Variáveis funcionais do ventrículo esquerdo obtidas por ecocardiograma ao final do período experimental

Variáveis	CTL (n=16)	CTL+APO (n=16)	DM (n=13)	DM+APO (n=14)
%Δ endo	51,7±5,03	48,3±4,11*	49,1±5,28	50,8±4,59
%Δ meso	25,9±3,02	25,1±3,53	25,8±2,36	26,3±3,05
VEPP	33,2±3,87	32,6±4,72	31,1±3,18	28,3±2,96 [#]
Onda E	86,4±11,2	84,9±11,2	76,6±7,50*	83,6±17,0
Onda A	50,0(43,5-66,0)	51,0(39,0-74,8)	55,0(50,0-65,8)	49,0(43,0-60,0)
E/A	1,72±0,56	1,64±0,58	1,38±0,45	1,70±0,38
TRIV	31,9±3,12	32,9±5,05	37,2±4,00*	38,9±5,57 [#]
TRIVn	66,9±5,68	71,4±10,9	76,2±7,09*	78,9±11,8 [#]
TDE	44,0(41,0-46,5)	41,0(39,0-45,0)	41,0(32,3-41,8)	33,0(30,0-33,0) [#]
Tei	0,61±0,09	0,61±0,12	0,60±0,09	0,61±0,12
S média	3,25(2,63-3,38)	2,75(2,50-3,19)	3,00(2,75-3,00)	2,75(2,50-3,00)
E' média	3,75(3,63-4,00)	3,50(3,25-4,00)	3,25(3,00-3,50)*	3,50(3,00-4,00)
A' média	3,00(2,63-3,50)	3,00(2,75-3,69)	3,00(2,69-3,56)	3,06(2,50-3,75)
E / E' média	23,3±4,65	24,3±5,03	23,6±4,19	24,1±5,99

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; %Δ meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (mm/s); Onda E: pico da velocidade do enchimento diastólico inicial (cm/s); Onda A: pico da velocidade do enchimento diastólico tardio (cm/s); E/A: razão entre as ondas E e A; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico (ms); TRIVn: TRIV normalizado pela frequência cardíaca; TDE: tempo de desaceleração da onda E (ms); Tei: índice de performance miocárdica; S': pico da velocidade de deslocamento sistólico do anel mitral (média das paredes lateral e septal, cm/s); p'ico 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+APO (ANOVA + esquema fatorial 2x2).

Estudo Funcional do Músculo Papilar

A Tabela 6 apresenta os valores do estudo funcional do músculo papilar isolado em 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. O grupo CTL+APO apresentou TD significativamente menor que o grupo CTL. A apocinina não alterou os valores das variáveis em animais diabéticos.

Os resultados obtidos em contrações isométricas após manobras inotrópicas estão apresentados na Tabela 7. Na PP30 o grupo CTL+APO apresentou menor TD e +dT/dt em relação ao CTL. Em todas as manobras, o grupo

diabético mostrou piora da +dT/dt, TPT e -dT/dt em relação ao grupo controle. O TPT e -dT/dt também apresentaram-se piores no grupo DM+APO em relação ao grupo CTL+APO em todas as manobras. O grupo diabético que recebeu a apocinina mostrou piora da -dT/dt somente na manobra PP30 em relação ao grupo diabético. No estudo funcional do músculo isolado a apocinina causou piora de alguns índices de função miocárdica em animais com ou sem diabetes, entretanto esses resultados não se mostraram consistentes.

Tabela 6. Variáveis funcionais obtidas em contrações isométricas na condição basal

Variáveis	CTL (n=13)	CTL+APO (n=11)	DM (n=11)	DM+APO (n=10)
AS (mm ²)	0,71±0,13	0,78±0,12	0,72±0,11	0,75±0,14
TD (g/mm ²)	11,2±2,37	9,22±1,35*	10,5±2,65	9,17±2,52
+dT/dt (g/mm ² /s)	112±24,9	96,2±18,2	92,4±23,1*	85,0±24,2 [#]
TPT (ms)	203±18,4	189±14,5	235±18,6*	227±17,7 [#]
-dT/dt (g/mm ² /s)	40,6±10,1	35,1±5,05	33,3±8,92*	27,5±8,31 [#]
TR (g/mm ²)	1,06±0,29	1,09±0,30	1,10±0,40	1,11±0,63

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; AS: área seccional do músculo papilar; 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).

Tabela 7. Variáveis funcionais do músculo isolado obtidas em contrações isométricas sob manobras inotrópicas positivas

Variáveis	CTL (n=13)	CTL+APO (n=11)	DM (n=11)	DM+APO (n=10)
TD	13,7±3,09	11,1±1,69*	11,9±3,01	10,3±2,87
+dT/dt	140±33,4	115±23,1*	105±25,0*	95,2±27,8
PP30 TPT	215±17,1	209±13,0	255±27,0*	250±22,6 [#]
-dT/dt	42,6±9,67	35,8±4,58	32,4±8,73*	25,1±8,45 ^{#§}
TR	1,04±0,30	1,06±0,31	1,24±0,52	1,25±0,62
TD	12,5±2,78	10,3±1,49	11,0±2,95	9,79±2,85
+dT/dt	140±31,9	117±21,4	108±28,0*	97,9±28,7
[Ca²⁺]_o TPT	192±16,9	186±17,8	224±23,2*	216±15,1 [#]
2,5 mM -dT/dt	48,3±10,6	40,0±6,27	38,4±11,6*	30,7±10,2 [#]
TR	0,87±0,30	0,90±0,31	0,90±0,34	0,92±0,52
TD	11,4(8,33-13,5)	9,70(8,77-10,1)	9,68(8,60-10,1)	9,47(6,08-10,8)
+dT/dt	136±34,0	118±22,4	96,9±26,6*	96,7±31,7
Iso TPT	163±11,1	157±9,49	184±16,9*	190±15,8 [#]
10⁻⁶ M -dT/dt	67,9±16,6	58,3±8,03	46,4±13,4*	39,1±13,7 [#]
TR	0,85±0,43	0,86±0,34	0,84±0,28	0,83±0,52

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; PP30: pós-pausa de 30 segundos; [Ca²⁺]_o 2,5 mM: elevação da concentração extracelular de cálcio para 2,5 mM; Iso: isoproterenol; 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; §: p<0,05 vs. DM (ANOVA + esquema fatorial 2x2).

Análise de Variáveis Anatômicas

Os valores obtidos da análise de variáveis anatômicas estão expostos na Tabela 8. Os grupos diabéticos apresentaram menores valores de VE e VD em relação aos seus respectivos controles. No entanto, após normalização para o peso corporal, os valores de VE e VD deixaram de apresentar diferença estatística entre os grupos DM e CTL; apenas o VE no grupo DM+APO continuou menor em relação ao grupo CTL+APO após normalização para o peso corporal. Os átrios mostraram-se menores no grupo diabético em relação ao controle, porém após normalização para o peso corporal, os grupos DM e DM+APO apresentaram valores maiores em relação aos seus respectivos controles.

A razão entre os pesos úmido e seco (U/S) do VE, VD não mostraram diferença entre os grupos. As razões U/S dos átrios e o fígado mostraram-se maiores no grupo diabético em relação ao controle. A razão U/S do pulmão apresentou valor menor no grupo DM+APO em relação ao grupo CTL+APO e DM.

Tabela 8. Variáveis anatômicas dos animais

Variáveis	CTL (n=18)	CTL+APO (n=18)	DM (n=14)	DM+APO (n=15)
PC (g)	362±25,1	364±27,3	254±36,1*	239±36,9 [#]
VE (g)	0,99±0,08	1,00±0,07	0,67±0,09*	0,62±0,07 [#]
VE/PC (g/kg)	2,69±0,15	2,79±0,27	2,57±0,19	2,58±0,20 [#]
VD (g)	0,22(0,20-0,25)	0,23(0,21-0,26)	0,16(0,15-0,17)*	0,15(0,14-0,16) [#]
VD/PC (g/kg)	0,60(0,55-0,67)	0,63(0,58-0,69)	0,61(0,57-0,64)	0,62(0,58-0,68)
Átrios (g)	0,09(0,08-0,09)	0,08(0,08-0,09)	0,07(0,06-0,08)*	0,07(0,06-0,08)
Átrios/PC (g/kg)	0,23(0,22-0,25)	0,23(0,21-0,25)	0,28(0,26-0,28)*	0,27(0,26-0,30) [#]
VE (U/S)	3,89(3,68-4,00)	3,96(3,83-4,08)	4,05(3,89-4,24)	4,11(3,98-5,40)
VD (U/S)	4,22±0,12	4,25±0,13	4,23±0,13	4,25±0,10
Átrios (U/S)	4,61±0,22	4,66±0,45	4,90±0,33*	4,76±0,33
Pulmão (U/S)	4,72±0,21	4,75±0,23	4,68±0,20	4,51±0,22 ^{#§}
Fígado (U/S)	3,07±0,07	3,11±0,07	3,15±0,13*	3,13±0,06

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; PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; U/S: razão entre os pesos úmido e seco. *: p<0,05 vs. CTL; #: p<0,05 vs. CTL+APO; §: p<0,05 vs. DM (ANOVA + esquema fatorial 2x2).

Avaliação do Colágeno e do Diâmetro do Miócito do Ventrículo Esquerdo

A concentração de hidroxiprolina miocárdica foi maior no grupo DM em relação ao CTL, e o grupo DM+APO não apresentou diferença significativa em relação aos grupos DM e CTL+APO. A fração colágena intersticial foi maior nos grupos diabéticos em relação aos seus respectivos controles, no entanto, não atingiu diferença estatística na comparação entre os grupos DM e CTL. Em relação à medida do diâmetro dos miócitos em amostras do VE, não observamos diferença significativa entre os grupos (Tabela 9).

Tabela 9. Avaliação bioquímica e morfométrica do tecido miocárdico do ventrículo esquerdo

Variável	CTL (n=10)	CTL+APO (n=10)	DM (n=10)	DM+APO (n=10)
HOP VE (mg/g)	2,66 ± 0,29	3,08 ± 0,58	3,27 ± 0,45*	3,29 ± 0,51
FCI VE (%)	6,95±2,57	5,47±2,41	9,93±3,59	9,47±4,30 [#]
Miócito (µm)	11,1(10,3-12,1)	10,3(10,3-12,2)	10,2(10,1-12,1)	10,6(9,88-11,0)

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; HOP VE: concentração de hidroxiprolina no miocárdio do ventrículo esquerdo; FCI VE: fração de colágeno intersticial no miocárdio do ventrículo esquerdo; Miócito: diâmetro do miócito. *: p<0,05 vs. CTL; [#]: p<0,05 vs. CTL+APO (ANOVA + esquema fatorial 2x2).

Análise da Expressão Proteica por Western Blotting

Os resultados obtidos da avaliação proteica por western blotting estão apresentados na Tabela 10. Houve menor expressão proteica do colágeno tipo III nos grupos diabéticos comparados aos seus respectivos controles. O colágeno tipo I, a razão entre os colágenos tipo I e III e a lisil oxidase não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A apocinina não influenciou os valores dessas variáveis.

Tabela 10. Avaliação da expressão proteica por Western Blotting

Variáveis	CTL (n=7)	CTL+APO (n=7)	DM (n=7)	DM+APO (n=7)
Colágeno tipo I	1,00±0,41	1,08±0,33	0,99±0,28	0,96±0,14
Colágeno tipo III	1,00±0,10	0,97±0,11	0,77±0,17*	0,83±0,10 [#]
Colágeno tipo I/tipo III	1,00±0,37	1,16±0,42	1,33±0,33	1,15±0,13
Lisil oxidase	1,00±0,19	0,91±0,15	0,90±0,20	0,89±0,13

Valores expressos em média e desvio padrão (unidade arbitraria). CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle e apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético e apocinina. *: p<0,05 vs. CTL; [#]: p<0,05 vs. CTL+APO (ANOVA + esquema fatorial 2x2).

Avaliação do Estresse Oxidativo Plasmático e Miocárdico

A Tabela 11 apresenta os valores da avaliação do estresse oxidativo no plasma. A atividade das enzimas antioxidantes SOD e GSH-Px foi menor nos grupos CTL+APO e DM em relação ao controle. O grupo CTL+APO também mostrou menor atividade da catalase comparado ao grupo controle e ao grupo

DM+APO; além disso, o grupo CTL+APO apresentou menor atividade da SOD em relação ao grupo DM+APO. O grupo DM mostrou menor atividade das enzimas SOD e GSH-Px em relação ao grupo DM+APO. A apocinina beneficiou a atividade das enzimas antioxidantes em animais diabéticos.

Em relação à avaliação da capacidade antioxidante hidrofílica (CAH), os grupos diabéticos apresentaram menores valores em relação aos respectivos controles. Não houve influência da apocinina nessa variável.

Tabela 11. Avaliação do estresse oxidativo no plasma

Variáveis	CTL (n=8)	CTL+APO (n=8)	DM (n=8)	DM+APO (n=8)
SOD	5,78±0,63	4,71±0,52*	4,97±0,39*	5,92±0,45 ^{#§}
GSH-Px	50,3±4,87	39,3±7,62*	20,4±4,53*	35,2±9,57 [§]
Catalase	2,99±0,60	1,25±0,53*	2,72±0,54	3,12±1,67 [#]
CAH	77,3±3,70	78,5±1,18	69,6±7,20*	72,0±4,85 [#]

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; SOD: superóxido dismutase (nmol/g de proteína); GSH-Px: glutathione peroxidase (nmol/mL); catalase: (U/mL); CAH: capacidade antioxidante hidrofílica (%). *: p<0,05 vs. CTL; #: p<0,05 vs. CTL+APO; §: p<0,05 vs. DM (ANOVA + esquema fatorial 2x2).

A avaliação do estresse oxidativo miocárdico (Tabela 12) mostrou elevação do hidroperóxido de lipídio no grupo DM, no entanto, a apocinina atenuou esse efeito. A atividade da enzima superóxido dismutase não diferiu entre os 4 grupos. A glutathione peroxidase foi menor nos grupos CTL+APO e DM em relação ao grupo CTL, e a apocinina aumentou a atividade dessa enzima no grupo diabético. A catalase foi maior no grupo DM em relação ao CTL. A apocinina reduziu a catalase nos animais diabéticos, no entanto permaneceu aumentado quando comparado ao grupo CTL+APO.

Tabela 12. Avaliação do estresse oxidativo miocárdico

Variáveis	CTL (n=8)	CTL+APO (n=8)	DM (n=8)	DM+APO (n=8)
HP	472±40,3	518±91,0	616±53,2*	538±64,7 [§]
SOD	16,3±1,46	16,4±1,38	17,2±1,95	17,0±2,14
GSH-Px	67,0±5,32	56,4±5,53*	49,8±6,13*	62,5±11,0 [§]
Catalase	120±20,9	120±21,0	167±11,2*	143±14,5 ^{#§}

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; HP: hidroperóxido de lipídio (nmol/g de tecido); SOD: superóxido dismutase (nmol/mg proteína); GSH-Px: glutathione peroxidase (nmol/mg tecido); Catalase (μmol/g tecido). *: p<0,05 vs. CTL; #: p<0,05 vs. CTL+APO; §: p<0,05 vs. DM (ANOVA + esquema fatorial 2x2).

A quantificação dos produtos finais de glicação avançada não mostrou diferença significativa entre os grupos (Tabela 13).

Tabela 13. Quantificação dos produtos finais de glicação avançada

Variáveis	CTL (n=10)	CTL+APO (n=10)	DM (n=10)	DM+APO (n=10)
AGEs (%)	2,47(2,35-4,16)	2,54(1,90-3,86)	2,61(1,83-4,16)	2,68(2,09-4,97)

Valores expressos em mediana e percentis 25% e 75%. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle e apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético e apocinina; AGEs: produtos finais de glicação avançada. (ANOVA + esquema fatorial 2x2).

Avaliação da Atividade da NADPH Oxidase no Miocárdio do Ventrículo Esquerdo

Os valores da análise da atividade da NADPH oxidase não mostraram diferenças significantes entre os 4 grupos (Tabela 14).

Tabela 14. Avaliação da atividade da NADPH oxidase miocárdica

Variáveis	CTL (n=8)	CTL+APO (n=8)	DM (n=8)	DM+APO (n=8)
DHE uM	39,1(38,2-39,7)	39,9(39,0-40,2)	39,5(37,4-40,6)	39,4(38,2-40,2)
EOH uM	39,6(31,9-47,6)	38,4(31,7-40,2)	34,5(22,4-38,0)	33,2(29,1-40,1)
E uM	112(86,6-165)	97,5(85,9-222)	119(112-163)	129(106-164)

Valores expressos em mediana e percentis 25% e 75%. CTL: grupo controle; CTL+APO: grupo controle e apocinina; DM: grupo diabético; DM+APO: grupo diabético e apocinina; DHE: dihidroetídio; EOH: hidroxietídio; E: etídio. (ANOVA + esquema fatorial 2x2).

Discussão

Neste estudo avaliamos a influência da inibição da NADPH oxidase por apocinina sobre o remodelamento cardíaco em ratos espontaneamente hipertensos com diabetes mellitus. Este é o primeiro estudo que temos conhecimento que fez esse tipo de avaliação em animais hipertensos diabéticos.

Foram utilizados ratos com sete meses de idade, pois nessa faixa etária são considerados animais adultos jovens e hipertensos com hipertrofia do ventrículo esquerdo e disfunção diastólica (Wangler et al., 1982), sendo um bom modelo para avaliarmos a influência da apocinina sobre o remodelamento cardíaco.

Para assegurar que todos os animais apresentavam uniformidade dos níveis pressóricos e do acometimento cardíaco realizamos a aferição da pressão arterial e o ecocardiograma no início do período experimental.

A indução de diabetes mellitus foi realizada através da administração de estreptozotocina, 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). A estreptozotocina é uma substância tóxica para as células das ilhotas de Langerhans mais comumente usada para indução de diabetes tipo 1 em modelos experimentais. O mecanismo de ação dessa substância inclui uma cadeia de eventos que resulta na fragmentação do DNA das células beta, e evidências sugerem que a geração de EROs pela estreptozotocina pode ter papel essencial nessa fragmentação (Tjalve et al., 1976; Schnedl et al., 1994). As EROs podem, portanto, ter papel essencial no efeito diabetogênico da estreptozotocina (Takasu et al., 1991; Bedoya et al., 1996).

No presente estudo também utilizamos a 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, a dose utilizada de apocinina em ratos 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, optamos por utilizar a concentração de 16 mg/kg/dia, que é a mais relatada na literatura (Asaba et al., 2005; Olukman et al., 2010).

Os animais pertencentes aos grupos com diabetes mellitus apresentaram glicemia acima de 220 mg/dL, valor utilizado como referência para confirmar o estado diabético em ratos (Babu & Srinivasan, 1999), e ao final do período experimental apresentaram peso corporal menor em relação aos seus respectivos controles. A glicemia elevada e diminuição do peso corporal são

observados nesse modelo experimental (Ojha et al., 2014; Parvizi et al., 2014) e, igualmente a estudos anteriores, a apocinina não atenuou essas variáveis (Olukman et al., 2010; Rehman et al., 2014).

Em relação à pressão arterial sistólica, os valores não foram diferentes entre os grupos, portanto, consideramos que esse fator não interferiu nas diferenças encontradas no nosso estudo. Estudos utilizando ratos SHR diabéticos também não mostraram diferença na pressão arterial entre os grupos (Wienen et al., 2001; Rosa et al., 2013). Além disso, nossos resultados estão de acordo com os dados obtidos por Schlüter et al. (2008), que observaram que a apocinina não alterou a pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos.

Na avaliação ecocardiográfica, observamos aumento das cavidades esquerdas (DDVE e AE) dos animais diabéticos quando normalizados pelo peso corporal. Sabe-se que os diâmetros das cavidades cardíacas não são exatamente proporcionais ao peso corporal, assim essa normalização pode trazer erros de interpretação dos resultados (Moreira et al., 2006). Porém, diversos estudos utilizando o modelo experimental de diabetes mellitus induzido por estreptozotocina, tanto em ratos hipertensos como em normotensos, têm relatado aumento das cavidades ventriculares (Rosa et al., 2013; Marangoni et al., 2014). Em nosso estudo também observamos alentecimento do relaxamento do ventrículo esquerdo (TRIV e TRIVn) nos grupos diabéticos, estando de acordo com achados da literatura nesse modelo de diabetes (Rosa et al., 2013; Yong et al., 2013; Marangoni et al., 2014). A apocinina não influenciou as variáveis ecocardiográficas.

Na análise da função do músculo papilar isolado, os animais diabéticos apresentaram redução da função contrátil ($+dT/dt$ e TPT) e de relaxamento ($-dT/dt$), em condição basal e após manobras para avaliação da reserva contrátil. Em estudo prévio do nosso grupo, utilizando ratos espontaneamente hipertensos com diabetes mellitus, observamos esse mesmo prejuízo funcional em avaliação do músculo papilar (Rosa et al., 2013). Na condição basal, o grupo CTL+APO mostrou diminuição da tensão desenvolvida, e na manobra de pós-pausa de 30 segundos, a apocinina causou discreta piora da função miocárdica nos grupos CTL+APO e DM+APO.

O comprometimento do relaxamento miocárdico observado no músculo papilar dos animais diabéticos está de acordo com o aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico observado por ecocardiografia nesses animais. O

remodelamento ventricular e a disfunção diastólica são características da miocardiopatia diabética (Miki et al., 2013). Nossos resultados não apontam efeitos da apocinina no remodelamento cardíaco de ratos, porém na análise do músculo papilar, em manobra de pós-pausa de 30 segundos, os animais que receberam a droga apresentaram discreta piora da função. Avaliações realizadas no coração com o uso da apocinina são escassas na literatura, e apesar de alguns estudos relatarem a droga como promissora no combate contra a disfunção cardíaca, há indícios de efeitos prejudiciais da apocinina no organismo. Kelly et al. (2009) relataram que a apocinina em ratos idosos piorou o prognóstico do acidente vascular cerebral.

Igualmente a trabalhos anteriores (Wang et al., 2011; Rosa et al., 2013), a análise morfométrica mostrou que os pesos de VE, VD e átrios apresentam-se menores nos animais diabéticos em relação aos respectivos controles. No entanto, quando essas variáveis foram normalizadas pelo peso corporal essas diferenças não apareceram, ou os pesos dos órgãos dos animais diabéticos mostraram valores maiores. Apesar da apocinina não ter influenciado essas variáveis, na avaliação da congestão pulmonar por meio da razão peso úmido/seco, o pulmão dos animais diabéticos que receberam apocinina apresentou menor congestão em relação aos diabéticos sem apocinina. Além disso, os animais diabéticos apresentaram maior congestão dos átrios e fígado em relação aos controles, enquanto que os animais diabéticos que receberam apocinina não apresentaram diferença em relação aos controles. Esses benefícios da apocinina encontrados na análise morfológica e os relatos de outros estudos mostram a possível importância dessa droga no tratamento da miocardiopatia diabética (Roe et al., 2011; Rodiño-Janeiro et al., 2013).

Através das técnicas de determinação da hidroxiprolina, *picrosirius red* e western blotting, observamos a influência do diabetes mellitus na concentração de colágeno miocárdico. Os animais do grupo DM apresentaram aumento na concentração de hidroxiprolina, e os animais do grupo DM+APO mostraram aumento na fração de colágeno intersticial em relação aos respectivos controles. Na análise por western blotting, a quantidade de colágeno tipo III foi menor nos grupos diabéticos, e a razão entre os colágenos tipo I e III foi maior no grupo diabético em relação ao seu controle, porém sem diferença significativa. Sabe-se que tecidos contendo predominantemente colágeno do tipo I são mais rígidos que os tecidos compostos por maiores concentrações de fibras do tipo III (Brower et al., 2006;

López et al., 2009; López et al., 2010). A lisil oxidase, enzima responsável por fazer o “cross-linking” das fibras colágenas resultando na deposição de fibras insolúveis de colágeno, não mostrou diferença significativa entre os grupos (López et al., 2009; López et al., 2010).

As alterações nos níveis e tipos predominantes de colágeno são frequentemente observadas e consideradas como uma das principais contribuintes para a miocardiopatia diabética (Miki et al., 2013). A apocinina não influenciou na quantidade de colágeno miocárdico, igualmente a outro trabalho do nosso laboratório que a apocinina foi administrada em ratos wistar com diabetes induzido por estreptozotocina (Gimenes et al., 2013). Li et al. (2013b) relataram diminuição no depósito de colágeno miocárdico pela apocinina em camundongos com remodelamento cardíaco e fibrose causados pela administração de angiotensina II.

Observamos na análise do colágeno miocárdico que apesar da expressão proteica do colágeno tipo I não apresentar diferença significativa entre os grupos e a do colágeno tipo III estar diminuída nos animais diabéticos, a quantidade geral de colágeno observada nas técnicas de hidroxiprolina e picrosirius red foi maior nesses animais. Isso se deve, provavelmente, ao aumento de outros tipos de colágenos que compõem o miocárdio. Spiro & Crowley (1993) demonstraram aumento da concentração de colágeno tipo VI miocárdico em diabetes e hipertensão.

A avaliação da hipertrofia dos cardiomiócitos não mostrou diferença significativa entre os grupos. No modelo de diabetes induzido por estreptozotocina, geralmente não se observa hipertrofia dos cardiomiócitos, provavelmente pela hipoinsulinemia (Poornima et al., 2006; Maalouf et al., 2009). A apocinina não interferiu nessa variável.

Na avaliação do estresse oxidativo plasmático e miocárdico, como o esperado, observamos piora da atividade oxidativa nos animais diabéticos. A apocinina melhorou a atividade de enzimas antioxidantes, mas não interferiu na capacidade antioxidante hidrofílica. Antioxidantes hidrofílicos incluem a glutathione, o ácido úrico, vitamina C, tióis, proteoglicanas e ácido hialurônico, já os antioxidantes hidrofóbicos incluem principalmente as vitaminas E e A, flavonóides, ubiquinol, bilirrubina e melatonina (Lekeux & Kirschvink, 2009).

A redução do estresse oxidativo pela apocinina tem sido observada por investigadores (Matsunami et al., 2011; Li et al., 2013a) e até mesmo sendo cogitada

como sua principal função no organismo (Heumüller et al., 2008). No nosso estudo, a apocinina aumentou a atividade de algumas enzimas antioxidantes e diminuiu a quantidade de hidroperóxido de lipídio nos animais diabéticos. No entanto, houve diminuição na atividade das enzimas antioxidantes nos animais controles que receberam a apocinina, e isso levanta a hipótese de em certos casos a apocinina atuar como um agente pró-oxidante, mas este comportamento ainda não está esclarecido na literatura (Vejrazka et al., 2004, Riganti et al., 2006; Castor, 2010). Talvez um dos motivos seja pelo quadro hipertensivo não estar tão avançado e não estar com baixa dos componentes antioxidantes e assim a apocinina atuar oxidando agentes tióis, ubiquinonas, entre outros, causando desequilíbrio na atividade antioxidante do organismo (Castor, 2010).

Sabe-se que a produção de AGEs é umas das principais vias de danos oxidativos causados pelo diabetes mellitus; além disso, estudos têm demonstrado aumento desses produtos na hipertensão. Desse modo, acreditamos que a diferença estatística não encontrada entre os grupos diabéticos e controles seja por indivíduos hipertensos também apresentarem aumento na produção de AGEs (McNulty et al., 2007; Vasdev et al., 2007). A apocinina não influenciou essa variável.

O ponto chave do nosso trabalho foi verificar se de fato ocorreu o bloqueio da atividade da NADPH oxidase pela apocinina no coração. 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 do dihidroetídio (DHE). O DHE é amplamente utilizado 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 o DHE em produtos fluorescentes. A oxidação do DHE forma os compostos etídio e o 2-hidroxi-etídio (EOH), e este último é separado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detecção por fluorescência. A formação do EOH está associada à oxidação específica do DHE pelo superóxido, enquanto que a produção de etídio estaria relacionada à oxidação do DHE por outras espécies reativas (Zhao et al., 2003; Fink et al., 2004; Fernandes et al., 2007). Assim, o DHE quantificado de células e tecidos representa o estresse oxidativo total, isto é, a soma dos compostos fluorescentes etídio e EOH.

Em relação ao nosso estudo, os resultados sugerem que a apocinina não foi capaz de bloquear o complexo enzimático NADPH oxidase em cardiomiócitos. Em outro trabalho realizado em 2013 em nosso laboratório, também não observamos bloqueio da NADPH oxidase pela apocinina (Gimenes et al., 2013).

Os estudos com a apocinina são controversos, alguns defendem a hipótese de que ela atua como bloqueadora da NADPH oxidase apenas em células fagocíticas. Células fagocíticas ativam a apocinina através da mieloperoxidase, e depois de sua ativação ela impede que os componentes citosólicos da NADPH oxidase se juntem a componentes de membrana, impedindo a ativação do complexo enzimático. Alguns autores sugerem que em células não fagocíticas a apocinina não pode ser ativada para bloquear a NADPH oxidase por não apresentar as mieloperoxidases (Riganti et al., 2006; Heumüller et al., 2008). No entanto, Touyz et al. (2008) sugerem que a apocinina pode ser ativada por outras peroxidases ou através de mieloperoxidases secretadas por neutrófilos.

Ainda há controvérsias no uso da apocinina em relação ao seu papel no estresse oxidativo. Há relato de a apocinina atuar como um agente antioxidante (Heumüller et al., 2008) ou atuar aumentando as espécies reativas de oxigênio em células não fagocíticas (Vejrazka et al., 2004; Riganti et al., 2006; Castor, 2010).

Além da apocinina existem outros possíveis inibidores da NADPH oxidase tais como difenileno-iodônio, GKT137831, ML171, VAS2870, entre outros. Porém, a especificidade dessas substâncias no bloqueio efetivo do complexo enzimático tem sido questionada. Desse modo, o uso da apocinina também tem sido questionado por sua inespecificidade no bloqueio da NADPH oxidase. Além disso, ainda são necessários vários estudos para elucidar os NOXs específicos envolvidos em cada tipo de patologia e seus mecanismos de ativação (Altenhofer et al., 2014).

Nossos achados sugerem que mais estudos são necessários para um posicionamento do uso da apocinina no combate não apenas das doenças cardiovasculares, mas em qualquer outra patologia, pois os mecanismos de ativação, ação e toxicidade da apocinina são contraditórios e pobremente entendidos.

Conclusão

A apocinina reduz o estresse oxidativo e não atenua o remodelamento cardíaco causado pelo diabetes mellitus e, provavelmente, não bloqueia a NADPH oxidase em cardiomiócitos. Indícios de prejuízo na função ventricular e miocárdica e na atividade das enzimas antioxidantes, em animais hipertensos sem diabetes, alertam para a cautela no uso dessa substância.

Referências

AEBI, H. Methods of Enzymatic Analysis (second ed.) Verlag Chemie Weinheim, New York (1974).

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

Akki A, Zhang M, Murdoch C, Brewer A, Shah AM. NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47:15-22

Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539-53.

Alderman MH, Cohen H, Madhavan S. Diabetes and cardiovascular events in hypertensive patients. *Hypertension* 1999;33:1130-4.

Altenhöfer S, Radermacher KA, Kleikers PW, Wingler K, Schmidt HH. Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Feb 26. [Epub ahead of print]

Anversa P, Beghi C, McDonald SL, Levicky V, Kikkawa Y, Olivetti G. Morphometry of right ventricular hypertrophy induced by myocardial infarction in the rat. *Am J Pathol* 1984;116:504-13.

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.

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.

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.

Beretta G, Aldini G, Facino RM, Russell RM, Krinsky NI, Yeum KJ. Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal Biochem* 2006;354:290-8.

Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, Miller RJ. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 1996;16:1324-36.

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.

Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr Hypertens Rep* 2010;12:135-42.

Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, et al. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;30:604-10.

Bugger H, Abel ED. Rodent models of diabetic cardiomyopathy. *Dis Model Mech* 2009;2:454-66.

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

Cave A, Grieve D, Johar S, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005;360:2327-34.

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.

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.

Dhaunsi GS, Yousif MH, Akhtar S, Chappell MC, Diz DI, Benter IF. Angiotensin-(1-7) prevents diabetes-induced attenuation in PPAR-gamma and catalase activities. *Eur J Pharmacol* 2010;638:108-14.

Dias IH, Griffiths HR. Oxidative stress in diabetes - circulating advanced glycation end products, lipid oxidation and vascular. *Ann Clin Biochem* 2014;51(Pt 2):125-7.

Ding H, Hashem M, Triggle C. Increased oxidative stress in the streptozotocin-induced diabetic apoE-deficient mouse: changes in expression of NADPH oxidase subunits and eNOS. *Eur J Pharmacol* 2007;567:121-8.

Epifanio HB, Zornoff LA, Matsubara BB, de Paiva SA, Inoue RM, Matsubara LS. Myocardial remodeling after experimental acute myocardial infarction in rats. Effect of renin-angiotensin-aldosterone blockade. *Arq Bras Cardiol* 2005;84:10-4.

Factor SM, Borczuk A, Charron MJ, Fein FS, van Hoeven KH, Sonnenblick EH. Myocardial alterations in diabetes and hypertension. *Diabetes Res Clin Pract* 1996;31 Suppl:S133-42.

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.

Fink B, Laude K, Mc Cann 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.* 2004;287:C895-C902.

Fiorentino TV, Priolella A, Zuo P, Folli F. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* 2013;19:5695-703.

Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010;107:1058-70.

Gill PS, Wilcox CS. NADPH oxidases in the kidney. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1597–607.

Gimenes C, Gimenes R, Rosa CM, Guirado GN, Cezar MDM, Campos DHS, et al. Effect of physical exercise on cardiac remodeling and oxidative stress in diabetic rats. *Eur Heart J* 2012;32:741.

Gimenes R. Influência da inibição da NADPH oxidase sobre o remodelamento cardíaco de ratos com diabetes mellitus. [Dissertação de Mestrado]. Botucatu – SP: Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp; 2013.

Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2013;127:e6-e245.

González A, Fortuño MA, Querejeta R, Ravassa S, López B, López N, et al. Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2003;59:549-62.

Grossman E, Messerli FH. Hypertension and diabetes. *Adv Cardiol* 2008;45:82-106.

Grossman E, Rosenthal T. Hypertensive heart disease and the diabetic patient. *Curr Opin Cardiol* 1995;10:458-65.

Gut AL, Sugizaki MM, Okoshi MP, Carvalho RF, Pai-Silva MD, Aragon FF, et al. Food restriction impairs myocardial inotropic response to calcium and beta-adrenergic stimulation in spontaneously hypertensive rats. *Nutr Res* 2008;28:722-7.

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.

Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G, et al. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:2164-71.

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.

Kelly KA, Li X, Tan Z, VanGilder RL, Rosen CL, Huber JD. NOX2 inhibition with apocynin worsens stroke outcome in aged rats. *Brain Res* 2009;1292:165-72.

Khavandi K, Khavandi A, Asghar O, Greenstein A, Withers S, Heagerty AM, et al. Diabetic cardiomyopathy - a distinct disease? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009;23:347-60.

Kinkade K, Streeter J, Miller FJ. Inhibition of NADPH oxidase by apocynin attenuates progression of atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 2013;14:17017-28.

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

Kuroda J, Sadoshima J. NADPH oxidase and cardiac failure. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010;3:314-20.

Laakso M, Heart in Diabetes: A Microvascular Disease. *Diabetes Care* 2011; 34 Suppl 2:S145–9.

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.

Laslett LJ, Alagona P Jr, Clark BA 3rd, Drozda JP Jr, Saldivar F, Wilson SR, et al. The worldwide environment of cardiovascular disease: prevalence, diagnosis, therapy, and policy issues: a report from the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 2012;60 Suppl:S1-49.

Lekeux P, Kirschvink N. Antioxidants and Horse Health. In: Robinson E, Sprayberry KA, eds. *Current Therapy in Equine Medicine*. 6th ed. Philadelphia, PA, USA: Saunders Elsevier; 2009. p. 75.

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 J, Shu H, Shen E, Wan L, Arnold JM, Peng T. Deficiency of Rac1 blocks NADPH oxidase activation, inhibits endoplasmic reticulum stress and reduces myocardial remodeling in type-I diabetic mice. *Diabetes* 2010;59:2033–42.

Li M, Liu Z, Zhuan L, Wang T, Guo S, Wang S, et al. Effects of apocynin on oxidative stress and expression of apoptosis-related genes in testes of diabetic rats. *Mol Med Rep* 2013a;7:47-52.

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.

Li YQ, Li XB, Guo SJ, Chu SL, Gao PJ, Zhu DL, et al. Apocynin attenuates oxidative stress and cardiac fibrosis in angiotensin II-induced cardiac diastolic dysfunction in mice. *Acta Pharmacol Sin* 2013b;34:352-9.

López B, González A, Hermida N, Valencia F, de Teresa E, Díez J. Role of lysyl oxidase in myocardial fibrosis: from basic science to clinical aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:H1-9.

López B, Querejeta R, González A, Beaumont J, Larman M, Díez J. Impact of treatment on myocardial lysyl oxidase expression and collagen cross-linking in patients with heart failure. *Hypertension* 2009;53:236-42.

Lotufo PA. Epidemiologia da hipertensão arterial no Brasil. In: Serrano CV Jr, Timerman A, Stefanini E, eds. *Tratado de Cardiologia - Socesp*. 2a ed. São Paulo: Manole; 2009:625-35.

Lu J, Pontré B, Pickup S, Choong SY, Li M, Xu H, et al. Treatment with a copper-selective chelator causes substantive improvement in cardiac function of diabetic rats with left-ventricular impairment. *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:28.

Maalouf R, Eid AA, Gorin Y, Escobar P, Agrawal M, Abboud H, et al. Models and mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Circulation* 2009;120 Suppl:S457.

MacCarthy PA, Grieve DJ, Li JM, Dunster C, Kelly FJ, Shah AM. Impaired endothelial regulation of ventricular relaxation in cardiac hypertrophy. Role of reactive oxygen species and NADPH oxidase. *Circulation* 2001;104:2967-74.

Mancia G. The association of hypertension and diabetes: prevalence, cardiovascular risk and protection by blood pressure reduction. *Acta Diabetol* 2005;42 Suppl 1:S17-25.

Maraldi T. Natural compounds as modulators of NADPH oxidases. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:271602.

Marangoni MN, Brady ST, Chowdhury SA, Piano MR. The co-occurrence of myocardial dysfunction and peripheral insensate neuropathy in a streptozotocin-induced rat model of diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2014;13:11.

Matheus AS, Tannus LR, Cobas RA, Palma CC, Negrato CA, Gomes Mde B. Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update. *Int J Hypertens* 2013;2013:653789.

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.

Matsunami T, Sato Y, Hasegawa Y, Ariga S, Kashimura H, Sato T, et al. Enhancement of reactive oxygen species and induction of apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Int J Clin Exp Pathol* 2011;4:255-66.

McNulty M, Mahmud A, Feely J. Advanced glycation end-products and arterial stiffness in hypertension. *Am J Hypertens* 2007;20:242-7.

Miki T, Yuda S, Kouzu H, Miura T. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features. *Heart Fail Rev* 2013;18:149-66.

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.

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.

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. *Biochim Biophys Acta* 1974;358:251-61.

Ojha S, Alkaabi J, Amir N, Sheikh A, Agil A, Fahim MA, et al. Withania coagulans fruit extract reduces oxidative stress and inflammation in kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats. *Oxid Med Cell Longev* 2014;2014:201436.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963;27:282-93.

- Okamoto K, Tabei R, Fukushima M, Nosaka S, Yamori Y. Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1966;30:703-16.
- 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.
- Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Dal Pai-Silva M, Gut AL, Padovani CR, et al. Myocardial remodeling and dysfunction are induced by chronic food restriction in spontaneously rats. *Nutr Res* 2006;26:567-72.
- 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.
- Pagidipati NJ, Gaziano TA. Estimating deaths from cardiovascular disease: a review of global methodologies of mortality measurement. *Circulation* 2013;127:749-56.
- 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.
- Paletta-Silva R, Rocco-Machado N, Meyer-Fernandes JR. NADPH oxidase biology and the regulation of tyrosine kinase receptor signaling and cancer drug cytotoxicity. *Int J Mol Sci* 2013;14:3683-704.
- Papapostolou I, Patsoukis N, Georgiou CD. The fluorescence detection of superoxide radical using hydroethidine could be complicated by the presence of heme proteins. *Anal Biochem* 2004;332:290-8.
- Pappachan JM, Varughese GI, Sriraman R, Arunagirinathan G. Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnostic evaluation and management. *World J Diabetes* 2013;4:177-89.
- Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 2008;31 Suppl 2:S170-80.

Parvizi MR, Parviz M, Tavangar SM, Soltani N, Kadkhodae M, Seifi B, et al. Protective effect of magnesium on renal function in STZ-induced diabetic rats. *J Diabetes Metab Disord* 2014;13:84.

Pechánová O, Jendeková L, Vranková S. Effect of chronic apocynin treatment on nitric oxide and reactive oxygen species production in borderline and spontaneous hypertension. *Pharmacol Rep* 2009;61:116-22.

Pereira B, Costa-Rosa LF, Bechara EJ, Newsholme P, Curi R. Changes in the TBARs content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of adrenalectomized rats. *Braz J Med Biol Res* 1998;31:827-33.

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 LJ, Sampaio WO. Redox unbalance: NADPH oxidase as therapeutic target in blood pressure control. *Arq Bras Cardiol* 2010;94:643-51.

Rehman A, Dugic E, Benham C, Lione I, Mackenzie LS. Selective inhibition of NADPH oxidase reverses the over contraction of diabetic rat aorta. *Redox Biology* 2014;2:61–4.

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

Rodiño-Janeiro BK, Paradela-Dobarro B, Castiñeiras-Landeira MI, Raposeiras-Roubín S, González-Juanatey JR, Alvarez E. Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology. *Vasc Health Risk Manag* 2013;9:401-28.

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

Rosa CM. Influência do diabetes mellitus no coração de ratos senescentes espontaneamente hipertensos. [Dissertação de Mestrado]. Botucatu – SP: Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp; 2011.

Rosa CM, Xavier NP, Campos DHS, Fernandes AA, Cezar MD, Martinez PF, et al. Diabetes mellitus activates fetal gene program and intensifies cardiac remodeling and oxidative stress in aged spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:152.

Rugale C, Cordaillat M, Mimran A, Jover B. Prevention and reversal by enalapril of target organ damage in angiotensin II hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2005;6:154-60.

Schlüter T, Steinbach AC, Steffen A, Rettig R, Grisk O. Apocynin-induced vasodilation involves Rho kinase inhibition but not NADPH oxidase inhibition. *Cardiovasc Res* 2008;80:271-9.

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

Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;87:4-14.

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.

Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997;82:291-5.

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.

Simons JM, Hart BA, Ip Vai Ching TR, Van DH, Labadie RP. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic Biol Med* 1990;8:251–8.

Sociedade Brasileira de Hipertensão. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol* 2010;95 Supl 1:1-51.

Sowers JR, Epstein M. Diabetes mellitus and associated hypertension, vascular disease, and nephropathy. An update. *Hypertension* 1995;26:869-79.

Spiro MJ, Crowley TJ. Increased rat myocardial type VI collagen in diabetes mellitus and hypertension. *Diabetologia* 1993;36:93-8.

Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, Verhoeven AJ. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11:95–102.

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

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

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

Teshima Y, Takahashi N, Nishio S, Saito S, Kondo H, Fukui A, et al. Production of reactive oxygen species in the diabetic heart – roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Circ J* 2014;78:300-6.

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

Toma L, Stancu CS, Botez GM, Sima AV, Simionescu M. Irreversibly glycated LDL induce oxidative and inflammatory state in human endothelial cells; added effect of high glucose. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390:877–82.

Touyz RM. Apocynin, NADPH oxidase and vascular cells: a complex matter. *Hypertension* 2008;51:172-4.

Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res* 1981;48:309-19.

Unger BS, Patil BM. Apocynin improves endothelial function and prevents the development of hypertension in fructose fed rat. *Indian J Pharmacol* 2009;41:208-12.

van Heerebeek L, Hamdani N, Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF, Begieneman MP, Bronzwaer JG, et al. Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* 2012;126:830-9.

Vasdev S, Gill V, Singal P. Role of advanced glycation end products in hypertension and atherosclerosis: therapeutic implications. *Cell Biochem Biophys* 2007;49:48-63.

Vejrazka M, Mícek R, Stípek S. Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. *Biochim Biophys Acta* 2004;1722:143-7.

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.

Wangler RD, Peters KG, Marcus ML, Tomanek RJ. Effects of duration and severity of arterial hypertension and cardiac hypertrophy on coronary vasodilator reserve. *Circ Res* 1982;51:10-8.

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.

Williams B. Blood pressure and diabetes: a fatal attraction. *Eur Heart J* 2013;34:3395–7.

World Health Organization. A global brief on hypertension. Silent killer, global public health crisis. Geneva, Switzerland: WHO, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/en/>. Acesso em 03 de novembro de 2014.

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.

Yang H, Jin X, Kei Lam CW, Yan SK. Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1773-82.

Yong QC, Thomas CM, Seqqat R, Chandel N, Baker KM, Kumar R. Angiotensin type 1a receptor-deficient mice develop diabetes-induced cardiac dysfunction, which is prevented by renin-angiotensin system inhibitors. *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:169.

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.

Zhao WC, Zhang B, Liao MJ, Zhang WX, He WY, Wang HB, Yang CX. Curcumin ameliorated diabetic neuropathy partially by inhibition of NADPH oxidase mediating oxidative stress in the spinal cord. *Neurosci Lett* 2014;560:81-5.

Zhou G, Li X, Hein DW, Xiang X, Marschall JP, Prabhu SD, et al. Metallothionein suppresses angiotensin II-induced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation, nitrosative stress, apoptosis, and pathological remodeling in the diabetic heart. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:655-66.