

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina de Botucatu**

**Influência do Diabetes Mellitus no Coração de
Ratos Senescentes Espontaneamente Hipertensos**

Camila Moreno Rosa

**Botucatu – São Paulo
2011**

Camila Moreno Rosa

Influência do Diabetes Mellitus no Coração de Ratos Senescentes Espontaneamente Hipertensos

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

Orientador: Prof. Dr. *Katashi Okoshi*

Co-orientadora: Profa. Dra. *Ana Angélica Henrique Fernandes*

Botucatu – São Paulo

2011

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

Rosa, Camila Moreno.

Influência do diabetes mellitus no coração de ratos senescentes espontaneamente hipertensos / Camila Moreno Rosa. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Katashi Okoshi

Co-orientadora: Ana Angélica Henrique Fernandes

Capes: 40101100

1. Insuficiência cardíaca. 2. Ecocardiografia. 3. Diabetes. 4. Hipertensão.

Palavras-chave: Diabetes mellitus; Estresse oxidativo; Hipertensão arterial sistêmica; Ratos espontaneamente hipertensos; Remodelação cardíaca.

"Enquanto suspiramos por uma vida sem dificuldades, devemos nos lembrar que o carvalho cresce forte através de ventos contrários e que os diamantes são formados sob pressão."

(Peter Marshall)

"Lutar sempre, vencer talvez, desistir jamais."

(Autor Desconhecido)

Dedicatória

A meus pais MARIA JOSÉ E FRANCISCO

Ao meu namorado IVAN

A toda minha FAMÍLIA e AMIGOS, que
me ajudaram em todos os momentos!

Agradecimentos

A DEUS por ter me abençoado na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. KATASHI OKOSHI, pela oportunidade, dedicação, ensinamentos e paciência. Muito obrigada pela aprendizagem e pelo privilégio de sua orientação.

À Profa. Dra. MARINA POLITI OKOSHI, pela confiança e valiosa ajuda nas etapas do trabalho.

À Profa. Dra. ANA ANGÉLICA HENRIQUE FERNANDES pela co-orientação, disponibilidade, por todo auxílio, estima e consideração.

Ao Prof. Titular ANTONIO CARLOS CICOGNA pelo acolhimento no laboratório e por transmitir ensinamentos importantes para toda a vida.

À Profa. Adjunta CÉLIA REGINA NOGUEIRA, pela delicadeza e por abrir as portas de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. LUIS CUADRADO MARTIN e ao Prof. Adjunto LEONARDO ANTONIO MAMEDE ZORNOFF, pela atenção e grande contribuição prestada no exame de qualificação.

Ao DIJON, que mesmo sem me conhecer, apresentou-me ao laboratório. Muito obrigada pela confiança e amizade.

À minha tia CLARICE e à tia do DIJON, SUELI, sem elas eu não teria chegado até o laboratório. Vocês foram fundamentais!

Às minhas amigas NATASHA e FERNANDA, por toda ajuda e companheirismo na realização das técnicas e principalmente pela amizade.

A todos os amigos e companheiros do laboratório: CAMILA GIMENES, MIRIANE, REGIANE, GABRIEL, JULIANA, RODRIGO GIMENES, DANI TOMAZ, DANI GUIZONI, CAMILA BONOMO, MARIA TEREZA, HELOÍSA, BRUNA, ADRIANA, CARLOS, MARCELO, ALINE, ANA PAULA, ANDRÉ LEOPOLDO, ANDRÉ NASCIMENTO, RENATA, PAULA, SÍLVIO, PAULINHA, LORENA, ARTHUR, LOUISE, ARIANE, BRUNO, DANI, CAROL, PAULO, LORETA, RENATA, LIDIANE, PRISCILA,

RICARDO, CRISTIANA, BERTHA, MARCOS, ROSÂNGELA, RODRIGO, DAMIANA.
Muito obrigada pela amizade e ajuda na realização do trabalho.

A todos os funcionários do Laboratório Experimental de Clínica Médica, JOSÉ CARLOS, CORINA, ELENIZE, CAMILA, MÁRIO, ROGÉRIO, DE LALLA, ÂNGELO, JOSÉ APARECIDO, SUELI CLARA, SUELI GARCIA, DENISE, VÍTOR, MARTA, SANDRA, pela colaboração, convivência e apoio.

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

Aos meus PAIS, muito obrigada pelo incentivo, pelos bons exemplos, por todo amor. Vocês são tudo em minha vida.

Ao meu namorado IVAN, por estar sempre ao meu lado e ser a pessoa com quem eu posso contar não importa qual seja a situação. Obrigada pelos conselhos, pelo incentivo, pelas risadas, pela amizade, pelo seu amor.

A toda minha FAMÍLIA e AMIGOS, por todo carinho.

Ao CNPQ, pelo suporte financeiro.

Sumário

Resumo	1
Abstract	4
Introdução	7
Objetivo	12
Material e Métodos.....	14
Resultados	24
Discussão.....	36
Conclusão	47
Referências Bibliográficas.....	49

Resumo

As doenças cardiovasculares (DCV) são responsáveis por alta taxa de morbidade e mortalidade, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento e, com o envelhecimento da população, a prevalência de seus fatores de risco está aumentando em ritmo alarmante. A hipertensão arterial sistêmica (HAS) e o diabetes mellitus (DM) estão entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento das DCV e, quando associados, aumentam o risco de lesões orgânicas e morte cardiovascular. No entanto, poucos estudos têm analisado a influência do DM sobre o coração de portadores de HAS, e os resultados são controversos. Além disso, não é do nosso conhecimento estudos experimentais no modelo de DM em animais idosos. Considerando essas questões, o objetivo foi analisar a influência do DM sobre a remodelação ventricular e o estresse oxidativo em ratos senescentes espontaneamente hipertensos. Métodos: Ratos espontaneamente hipertensos (SHR), machos, com 18 meses de idade, foram divididos em dois grupos: SHR-Controle (SHR-CTL, n=30) e SHR-Diabético (SHR-DM, n=50). O DM foi induzido por meio de administração intraperitoneal de estreptozotocina (40 mg/kg). O consumo diário de ração e água e o peso corpóreo semanal foram medidos. 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. O estresse oxidativo foi avaliado pela dosagem da concentração de hidroperóxido de lipídio e da atividade das enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase, no tecido cardíaco e no soro. Estatística: As comparações entre os grupos foram realizadas por teste *t* de Student não pareado ou teste de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição normal ou não normal, respectivamente. Os resultados são discutidos no nível de significância de 5%. Resultados: O grupo SHR-DM apresentou maior consumo de água e ração durante todo período experimental e menor peso corporal ao final do experimento. Não houve diferença significativa entre os

grupos nos valores da pressão arterial sistólica. Em relação às variáveis ecocardiográficas, o grupo diabético apresentou dilatação do VE e do átrio esquerdo, redução da espessura diastólica e da espessura relativa do VE e comprometimento da função sistólica e diastólica do VE. Na avaliação do músculo papilar, o grupo SHR-DM mostrou comprometimento da função contrátil miocárdica. Em relação às variáveis morfométricas, os pesos do VE, ventrículo direito e átrios foram menores no grupo diabético. No entanto, após normalização pelo peso corporal, somente o ventrículo direito foi menor nos animais diabéticos. O diâmetro dos miócitos, a fração colágena miocárdica e a concentração de hidroxiprolina miocárdica não apresentaram diferença significativa entre os grupos. As avaliações do estresse oxidativo no soro e no tecido miocárdico mostraram aumento da atividade pró-oxidante no grupo diabético. Diante desses resultados podemos concluir que o diabetes mellitus causa dilatação das câmaras cardíacas esquerdas e piora a função ventricular e miocárdica em ratos senescentes espontaneamente hipertensos, e estas alterações estão associadas a aumento do estresse oxidativo.

Palavras-chave: remodelação cardíaca, diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, ratos espontaneamente hipertensos, senescência, ecocardiograma, músculo papilar, estresse oxidativo.

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) are responsible for high morbidity and mortality rate in both developed and developing countries. With the population aging, the prevalence of CVD risk factors is increasing at alarming rate. Arterial hypertension (AH) and diabetes mellitus (DM) are major risk factors for development of CVD, and when combined increase the risk of organ damage and cardiovascular death. However, few studies have examined the influence of diabetes on the heart of hypertensive patients, and the results are controversial. Moreover, to the best of our knowledge, there is no study in the animal model of DM in the elderly. Therefore, the aim of this study was to analyze the influence of diabetes on ventricular remodeling and oxidative stress in senescent spontaneously hypertensive rats. Methods: Eighteen-month old male spontaneously hypertensive rats (SHR) were divided into two groups: SHR-Control (SHR-CTL, n=30) and SHR-Diabetic (SHR-DM, n=50). DM was induced by intraperitoneal administration of streptozotocin (40 mg/kg). Daily consumption of food and water and weekly body weight were measured. *In vivo* cardiac structural and functional parameters were measured by echocardiography. *In vitro* myocardial function was analyzed in left ventricular (LV) papillary muscles. 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 samples were obtained to measure myocyte diameters, collagen fractional area, and hydroxyproline concentration. Oxidative stress was assessed by measuring lipid hydroperoxide concentration and superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities, in LV tissue and serum. Statistics: Comparisons between groups were performed by unpaired Student's *t* test or Mann-Whitney test, according to normal or non-normal distribution, respectively. Results are discussed at the significance level of 5%. Results: SHR-DM group showed higher consumption of water and food during all experimental period and lower body weight at the end of experiment. Systolic blood pressure was not different between the groups. Echocardiographic study showed LV and left atrial dilatation, LV diastolic thickness and LV relative wall thickness reduction, and LV systolic and diastolic functional impairment in the SHR-DM group. In the papillary muscle assessment, SHR-DM group presented impaired myocardial contractile function.

LV, right ventricle, and atria weights were lower in SHR-DM. However, after normalization for body weight, only right ventricle weight was smaller in diabetic animals. Myocyte diameters, myocardial collagen fractional area and hydroxyproline concentration were not different between the groups. Assessment of oxidative stress in serum and LV myocardial tissue showed increased pro-oxidant activity in the diabetic group. We can conclude that DM causes dilatation of left cardiac chambers and impairs LV myocardial and ventricular function in aged spontaneously hypertensive rats, and these alterations are associated with increased oxidative stress.

Key-words: cardiac remodeling, systemic arterial hypertension, spontaneously hypertensive rats, senescence, echocardiography, papillary muscle, oxidative stress.

Introdução

As doenças cardiovasculares (DCV) são responsáveis por alta taxa de morbidade e mortalidade, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (Gersh et al., 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as DCV foram responsáveis por aproximadamente 30% da mortalidade mundial em 2004. Entre as principais DCV, a doença arterial coronariana e o acidente vascular encefálico corresponderam a 12,2% e 9,7% do total de óbitos, respectivamente (WHO, 2004).

No Brasil, as DCV também representam a principal causa de mortalidade geral. Em 2005, 28,2% dos óbitos foram causados por DCV (mais de 280.000 pessoas). Em relação as causas específicas, a doença cerebrovascular (8,9%) e a doença arterial coronariana (8,4%) foram as duas principais causas de morte da população brasileira (Souza & Alencar, 2009). Portanto, as DCV são motivos de preocupação da comunidade médica e de autoridades governamentais, considerando também que acomete indivíduos adultos jovens na idade produtiva causando invalidez parcial ou total, ocasionando 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).

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). Em termos globais, estima-se o aumento da prevalência de HAS nos próximos anos, de 26,5% no ano 2000 para 29,2% em 2025 (Grossman et al., 2008). No Brasil, a prevalência de HAS é elevada, e aproximadamente 30% da população brasileira adulta acima de 25 anos de idade são hipertensos (Lotufo, 2009; Cesarino et al., 2008; Rosário et al., 2009). Sabe-se que a prevalência e a gravidade da HAS aumentam de acordo com a elevação da faixa etária (Souza et al., 2007; Babatsikou & Zavitsanou, 2010).

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. Em idade mais avançada (18-24 meses), pode ocorrer deterioração da função miocárdica, dilatação do ventrículo esquerdo e desenvolvimento de falência cardíaca. O agravamento da disfunção ventricular e o aparecimento de sinais clínicos de insuficiência cardíaca têm sido atribuídos ao comprometimento da contratilidade e da piora da função diastólica do músculo cardíaco (Conrad et al., 1991; Bing et al., 1995).

O complexo mecanismo envolvido nas alterações cardíacas, independentemente da causa, é conhecido como remodelação cardíaca. De acordo com o consenso do *International Forum on Cardiac Remodeling*, a remodelação cardíaca é definida como alterações gênicas, moleculares, celulares e intersticiais que se manifestam clinicamente como modificações no tamanho, na forma e na função do coração em resposta a uma determinada agressão (Cohn et al., 2000).

Sabe-se que tanto a HAS como o DM causam ou agravam as DCV, e quando associadas aumentam o risco de lesões orgânicas e morte cardiovascular (Hypertension in Diabetes Study, 1993; Mancia, 2005; Ogochukwu & Victoria, 2010). Além disso, a prevalência dessas doenças aumenta com o envelhecimento (Assmann & Schulte, 1989; Babatsikou & Zavitsanou, 2010).

O DM, segundo a OMS, 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). Estima-se que, a prevalência de DM aumentará de 151 milhões de pessoas no ano 2000 para 300 milhões até 2025, mais de 5% da população mundial sofrerá desse mal (Grossman

et al., 2008). De acordo com dados da OMS, ainda neste século o Brasil terá aproximadamente 11 milhões de indivíduos com DM (Wild et al., 2004).

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 cardiomiopatia diabética.

A cardiomiopatia diabética (CMD) 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). Entre as alterações celulares está a perda anormal de cardiomiócitos por apoptose, causada principalmente pelo estresse oxidativo que ocorre no DM (Gonzalez et al., 2003; Khavandi et al., 2009). O aumento da atividade oxidativa ocorre em decorrência do desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio, em especial do ânion superóxido (O_2^-) e da capacidade de neutralização desses compostos por mecanismos antioxidantes (Russo et al., 1998). O aumento da atividade pró-oxidante e a significativa diminuição de enzimas antioxidantes têm sido mostrados contribuir para o estresse oxidativo em diabetes. Kaul et al. (1996) relataram aumento da peroxidação lipídica e diminuição na atividade da superóxido dismutase e da glutathione peroxidase no coração de animais diabéticos.

Muitos estudos têm mostrado que o desenvolvimento de hipertensão em modelo de hipertensão genética, como o SHR, também está associado a maior produção de O_2^- em tecidos vasculares. Além disso, nos pacientes com HAS essencial tem sido observado baixos níveis de antioxidantes como as vitamina A e E, assim como redução da atividade da superóxido dismutase (Russo et al., 1998; Grossman, 2008).

No modelo experimental de rato com DM e HAS, o coração exibe fibrose miocárdica, alteração microvascular e congestão pulmonar. Esses animais apresentam elevada mortalidade e tem sido considerado novo modelo experimental utilizado para provocar danos vasculares e cardíacos similares aos vistos em humanos (Fein et al., 1984; Fein et al., 1989; Fein et al., 1990).

A disfunção diastólica do ventrículo esquerdo é o defeito mais proeminente da CMD, podendo ser observada diminuição da complacência, prolongamento do relaxamento miocárdico e alteração na homeostase do cálcio, sendo a disfunção sistólica a manifestação mais tardia (Fein et al., 1981; Ren & Bode, 2000; Boudina & Abel, 2010). Por outro lado, a cardiopatia hipertensiva é caracterizada por hipertrofia miocárdica, desorganização dos miócitos e miofibrilas e aumento do colágeno, com consequente disfunção diastólica isolada. Com a progressão da doença, ocorre também o surgimento do comprometimento sistólico do ventrículo esquerdo (Izzo & Gradman, 2004; Díez & Frohlich, 2010).

A HAS agrava as complicações cardiovasculares associadas ao DM e vice-versa. A co-existência das duas desordens resulta em maiores danos estruturais e funcionais cardíacos que aqueles causados por apenas uma delas e, frequentemente, resulta em insuficiência cardíaca congestiva prematura, morte súbita e infarto agudo do miocárdio (Grossman & Rosenthal, 1995; Sowers & Epstein, 1995; Factor et al., 1996; Mancia, 2005; Ker, 2010).

A combinação de DM e HAS causa alterações miocárdicas, denominada cardiomiopatia diabética-hipertensiva, como redução da contratilidade miocárdica e lesões suficientes para induzir doença miocárdica severa e potencialmente fatal (Fein et al., 1990; Rodgers et al., 1991; Grossman & Messerli, 2008). No entanto, Fiordaliso et al. (2007) não observaram alteração mais intensa nos ratos hipertensos com diabetes, em relação aos não diabéticos, no que se refere à quantificação de apoptose e produção de espécies reativas de oxigênio.

Poucos estudos têm analisado a influência do DM sobre o coração de animais portadores de HAS, e os resultados dos estudos ainda são controversos. Além disso, não é do nosso conhecimento estudos experimentais no modelo de DM em animais idosos.

Objetivo

Analisar a influência do diabetes mellitus, induzido por estreptozotocina, sobre a remodelação ventricular e o estresse oxidativo em ratos senescentes espontaneamente hipertensos.

Material e Métodos

Animais e constituição dos grupos

Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR), machos, com 18 meses de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: 1) grupo SHR-Controle (SHR-CTL, n=30), 2) grupo SHR-Diabético (SHR-DM, n=50). 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. 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 Chemicals Co.*), em dose única, na concentração de 40 mg/kg de peso corporal, diluída em tampão citrato 0,1M pH 4,5 (Hebden et al., 1986; Ozdemir et al., 2005; Fernandes et al., 2010). Os animais controle 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.

Todos os animais receberam ração comercial e água *ad libitum* e o consumo de ambos foi medido diariamente. Além disso, os animais foram pesados semanalmente, durante todo o período experimental, que foi de nove semanas.

Os animais foram alojados em gaiolas (1-2 ratos/gaiola), e foram mantidos em ambiente com temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) 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). Em seguida, o manguito foi insuflado a um valor superior à pressão arterial sistólica e desinsuflado. O registro das curvas de pressão arterial foi feito por um polígrafo (*Gould*, modelo RS 3200, OH, USA).

Estudo Ecocardiográfico

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

foram obtidas posicionando o cursor do modo-M ao nível do plano da valva aórtica. As imagens obtidas no modo-M foram registradas em uma impressora (Sony Co., modelo UP-895, Japan). Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas, manualmente, com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, Japan). As seguintes estruturas foram medidas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE; espessura diastólica parede posterior do VE (EDPP); espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV); diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A espessura relativa do VE foi calculada dividindo a EDPP pelo DDVE $[(EDPP \times 2) / DDVE]$. 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; de Paiva et al., 2003). O índice de MVE (IMVE) foi calculado normalizando a MVE para o peso corporal. A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico (% Δ endo) $[(DDVE - DSVE) / DDVE]$; 2) fração de ejeção $[(DDVE^3 - DSVE^3) / DDVE^3]$; 3) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior. A função diastólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; 2) razão onda E/onda A (E/A); 3) tempo de desaceleração da onda E (TDE); 4) tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela frequência cardíaca (TRIVn).

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., 2001; Gut et al., 2003; Sugizaki et al., 2005; Okoshi et al., 2006). 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 min) 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 com morfologia mais adequada 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 e 7,42 e a pressão parcial de oxigênio entre 550 e 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 mais a pós-carga, impediu que o músculo encurtasse passando a desenvolver somente força (contração isométrica). Após a 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, g/mm²), tensão de repouso (TR, g/mm²), tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida (TPT, ms), velocidade de variação da tensão desenvolvida (+dT/dt, g/mm²/s) e velocidade de decréscimo da tensão desenvolvida (-dT/dt, g/mm²/s). As contrações isométricas foram registradas utilizando sistema de aquisição de dados computadorizado (*Acqknowledge* MP100, Biopac Systems Inc.*). Com o objetivo de comparar o desempenho de músculos de tamanhos diferentes, os valores de TD, TR, +dT/dt e -dT/dt foram normalizados pelas respectivas áreas seccionais.

As variáveis morfológicas utilizadas para caracterizar os músculos papilares foram: comprimento (mm), peso (mg) e área seccional (AS, mm²). O comprimento (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 (Matsubara et al., 2000; Okoshi et al., 2004).

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 determinado período de repouso (10, 30 e 60 segundos). Passados 10 minutos, foi trocada a solução nutriente de Krebs-Henseleit para outra com concentração extracelular de Ca⁺⁺ de 0,625 mM, deixando o músculo se estabilizar por 10 minutos; a seguir, foi realizada elevação de cálcio para 1,25 mM, 2,25 mM e 5,0 mM, com cinco minutos de intervalo entre cada concentração. Após essas

manobras, o músculo foi recolocado em solução nutriente com Ca^{++} de 1,25 mM, deixando-se estabilizar por 10 minutos antes de dar início à manobra de adição de isoproterenol, nas concentrações de 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M, com 10 minutos de estabilização entre cada condição.

Análise Histológica do Coração

Após a pesagem dos ventrículos direito e esquerdo, foram cortados fragmentos da parte central do VE, com 3 a 5 mm de espessura. O material foi imerso em formalina 10% neutra e tamponada, durante 48 horas, a 4°C. Após esse período, o tecido foi lavado, desidratado e incluído em parafina. Cortes histológicos 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 40 X, conectado a computador equipado com um programa analisador de imagem (*Image-Pro Plus 3.0*, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Em secções transversas do VE, foram medidos os menores diâmetros transversos de, no mínimo, 50 fibras cardíacas nas quais o núcleo pôde ser claramente identificado (Ahmet et al., 2005).

Para avaliação do colágeno nas lâminas coradas por *picrosirius red*, foi utilizada a videodensitometria. Retidas as imagens, os componentes do tecido cardíaco foram identificados, segundo o realce de cor. Os filamentos de colágeno refletiram a cor vermelha, enquanto os miócitos foram vistos na coloração amarela. Áreas contendo vasos sanguíneos foram excluídas da análise.

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

Quantificação de Hidroxiprolina

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

Inicialmente foram obtidas as soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina (diluição 60 µl HOP / 2940 µl HCl) e a solução branca (água destilada). Previamente à execução do processamento bioquímico, foi necessária a preparação dos seguintes reagentes químicos: tampão borato 0,2 M (pH 8,7), tiosulfato de sódio 3,6 M e o reagente de Ehrlich. O processamento bioquímico para determinação da concentração de hidroxiprolina foi iniciado por secagem das soluções-padrão e das amostras no concentrador de amostras (*Speed Vac*). A hidrólise ácida foi realizada mediante adição de HCl 6 N em cada um dos tubos das amostras, que foram aquecidas na estufa à 100°C por 8 horas. A oxidação foi realizada após retirada e resfriamento dos tubos da estufa. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 minutos e colocadas novamente no concentrador de amostras (*Speed Vac*) por 3 horas. Retirada as amostras, foi adicionado em cada uma, 1mL de água destilada e tamponadas com solução tampão borato 0,2 M pH 8,7; após 20 minutos, a reação foi inibida com a solução tiosulfato de sódio 3,6 M e as amostras foram agitadas. Posteriormente, a solução foi saturada com KCl e colocada em banho-maria a 90°C. Os tubos foram resfriados e neles adicionados 2,5 mL de tolueno; em seguida, foram agitados por 5 minutos para a separação das fases água e tolueno. Foram retirados 1,5 mL de tolueno da solução e estes foram colocados em tubos de hemólise para serem acrescentados 0,6 mL de solução de Ehrlich. As amostras foram mantidas em repouso por 30 minutos a fim de se alcançar a estabilidade do cromógeno. A leitura foi realizada por espectrofotometria com filtro de 565 nm.

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 soro foi separado por centrifugação a 4.000 rpm, por 15 minutos, e foi utilizado para determinação da concentração de hidroperóxido de lipídio e da atividade da glutathione peroxidase e superóxido dismutase. Os níveis dessas enzimas avaliam a atividade antioxidante, e o nível de hidroperóxido de lipídio avalia a atividade pró-oxidante. 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 (0,1M) 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 e atividade da glutathione peroxidase e superóxido dismutase.

Determinações Séricas e Cardíacas

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, NADPH_2 , 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-tetrazóico (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.

Análise Estatística

Os dados numéricos são expostos como média ± desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75 de acordo com a distribuição normal ou não normal.

As comparações entre os grupos foram realizadas por teste *t* de Student não pareado ou teste de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição normal ou não normal, respectivamente.

Todos os resultados são discutidos no nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Aspectos Gerais

O estudo foi iniciado com oitenta animais, divididos nos grupos SHR-CTL (n=30) e SHR-DM (n=50). Essa proporção de ratos em cada grupo foi escolhida devido ao fato que, nesse modelo experimental de DM, não se espera que todos os animais atinjam o nível de glicemia acima de 220 mg/dL. De fato, isso ocorreu em 17 animais e foram descartados do estudo. Além disso, os animais diabéticos apresentam maior mortalidade devido à piora do estado geral. Nesse estudo, a mortalidade no grupo diabético foi de 52% (17 animais) e no grupo não diabético foi de 30% (9 animais). Embora a mortalidade tenha sido maior no grupo diabético, a análise de sobrevida não mostrou diferença estatisticamente significativa.

Ingestão de Água e Ração

A ingestão de água e ração foi medida durante todo o período experimental. Os valores de ingestão diária média de cada semana, expostos nos Gráficos 1 e 2, mostram maior consumo de água e ração pelo grupo diabético em relação ao grupo controle.

Glicemia

A dosagem da glicemia sérica foi realizada antes e após a indução do DM e antes do sacrifício dos animais. Antes da indução do DM não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Após a indução do DM e antes do sacrifício dos animais, o grupo diabético apresentou aumento significativo da glicemia em relação ao controle. Todos os valores da glicemia estão apresentados na Tabela 1.

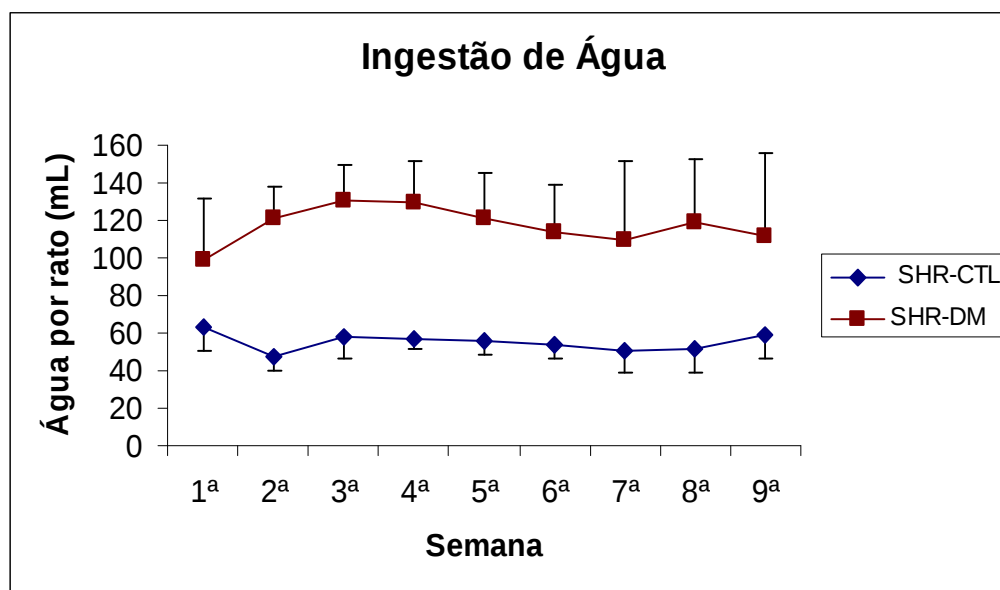


Gráfico 1: Média e desvio padrão do consumo diário de água por animal em suas respectivas semanas de avaliação. SHR-CTL: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) controle; SHR-DM: SHR-diabético. *: $p < 0,05$ vs. SHR-CTL em todos os momentos.

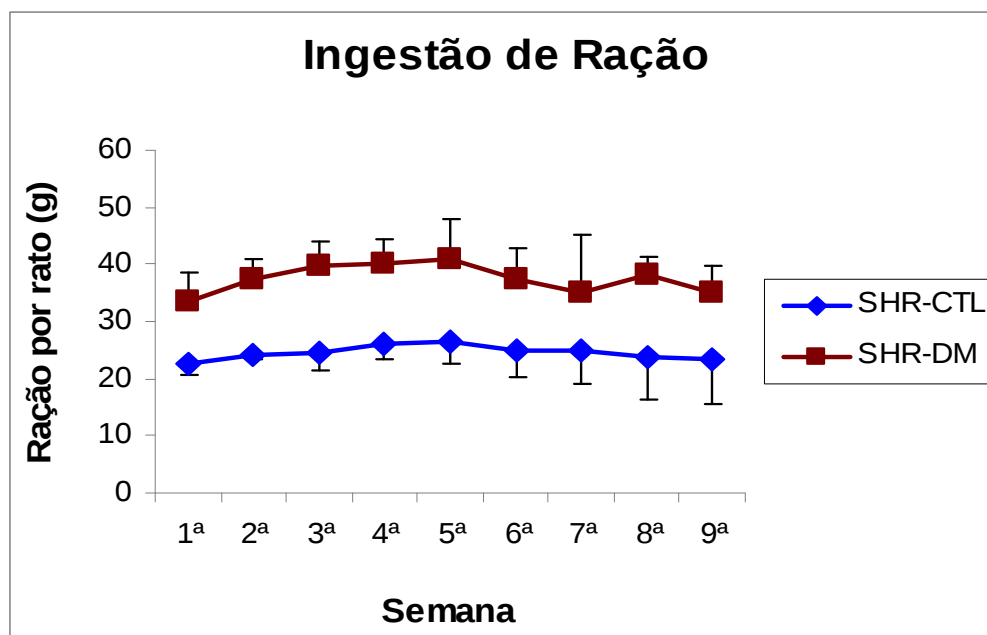


Gráfico 2: Consumo diário de ração por animal em suas respectivas semanas de avaliação. SHR-CTL: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) controle; SHR-DM: SHR-diabético. *: $p < 0,05$ vs. SHR-CTL em todos os momentos.

Peso Corporal

Na Tabela 2 são mostrados os valores do peso corporal dos animais. Pode-se observar que os mesmos não apresentavam diferença significativa no início do período experimental; no entanto, ao final do estudo o grupo SHR-DM apresentou redução significativa de peso em relação ao grupo SHR-CTL.

Tabela 1. Glicemia sérica dos animais

	SHR-CTL (n=21)	SHR-DM (n=16)	Valor P
Antes da indução do DM (mg/dL)	95,1 ± 18,5	101 ± 8,88	0,461
Após a indução do DM (mg/dL)	116 (103 - 123)	310 (287 - 421)	0,001
Antes do sacrifício (mg/dL)	89,1 ± 21,1	487 ± 28,7	0,001

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. SHR-CTL: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) - controle; SHR-DM: SHR-diabético. Valor P: resultado do teste estatístico SHR-DM vs. SHR-CTL (teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney).

Tabela 2. Peso corporal dos animais

	SHR-CTL (n=21)	SHR-DM (n=16)	Valor P
PC inicial (g)	370 ± 31,0	359 ± 22,2	0,118
PC final (g)	339 ± 38,3	277 ± 26,1	0,001

Dados expressos em média e desvio padrão. SHR-CTL: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) - controle; SHR-DM: SHR-diabético; PC: peso corporal. Valor P: resultado do teste estatístico SHR-DM vs. SHR-CTL (teste *t* de Student).

Pressão Arterial Sistólica

Na Tabela 3 estão expostos os valores da pressão arterial sistólica (PAS). Nos momentos inicial e final os grupos apresentaram valores semelhantes.

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

	SHR-CTL (n=21)	SHR-DM (n=16)	Valor P
PAS inicial (mmHg)	203 ± 23,4	223 ± 43,2	0,139
PAS final (mmHg)	193 ± 34,4	201 ± 36,0	0,524

Dados expressos em média e desvio padrão. SHR-CTL: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) - controle; SHR-DM: SHR-diabético. Valor P: resultado do teste estatístico SHR-DM vs. SHR-CTL (teste *t* de Student).

Avaliação Ecocardiográfica

O ecocardiograma transtorácico foi realizado no início e no final do período experimental. No período inicial não observamos diferenças estatisticamente significantes nas variáveis estruturais e funcionais entre os grupos. O ecocardiograma inicial teve como objetivo assegurar a homogeneidade dos animais que compuseram os grupos.

Na Tabela 4 estão apresentados os valores das variáveis estruturais cardíacas obtidas no final do experimento. A frequência cardíaca foi menor no grupo diabético. O diâmetro diastólico do VE normalizado pelo peso corporal e o diâmetro sistólico do VE foram maiores no grupo diabético em relação ao controle. O diâmetro diastólico do VE em valores absolutos não diferiu entre os grupos. A espessura diastólica da parede posterior do VE e do septo interventricular foram menores no grupo SHR-DM em relação ao grupo SHR-CTL. O diâmetro do átrio esquerdo normalizado pelo peso corporal foi maior no grupo SHR-DM em relação ao grupo controle. O diâmetro da aorta e do átrio esquerdo, em valores absolutos, não apresentaram diferença significativa entre os grupos. A massa e o índice de massa do VE não diferiram entre os grupos. A espessura relativa do VE foi menor no grupo SHR-DM em relação ao grupo SHR-CTL.

Os resultados da avaliação funcional do VE estão expostos na Tabela 5. Em relação à função sistólica, avaliada pela porcentagem de encurtamento endocárdico, fração de ejeção e a velocidade de encurtamento da parede posterior foram menores no grupo diabético em relação ao grupo controle. A avaliação da

Tabela 4. Análise ecocardiográfica das variáveis estruturais do coração ao final do período experimental

Variáveis	SHR-CTL (n=21)	SHR-DM (n=16)	Valor P
PC (g)	350 ± 32,7	290 ± 36,8	0,001
FC (bpm)	322 ± 40,1	287 ± 40,1	0,010
DDVE (mm)	8,56 ± 1,03	8,73 ± 0,77	0,572
DDVE/PC (mm/Kg)	24,2 (22,1 - 26,0)	31,2 (25,3 - 34,0)	0,001
DSVE (mm)	4,71 ± 1,27	5,54 ± 1,19	0,043
EDPP (mm)	1,83 (1,75 - 1,90)	1,72 (1,66 - 1,79)	0,031
EDSIV (mm)	1,86 (1,77 - 1,91)	1,74 (1,66 - 1,83)	0,023
AO (mm)	4,50 (4,45 - 4,85)	4,45 (4,30 - 4,90)	0,701
AE (mm)	7,46 ± 1,12	7,51 ± 1,27	0,900
AE/PC (mm/Kg)	21,5 ± 3,72	26,3 ± 5,82	0,003
Massa VE (g)	1,24 (1,05 - 1,39)	1,18 (1,05 - 1,41)	0,673
Índice MVE (g/Kg)	3,35 (3,12 - 4,04)	4,16 (3,27 - 5,05)	0,088
Esp. Rel. VE	0,44 ± 0,07	0,40 ± 0,05	0,046

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. SHR-CTL: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) - controle; SHR-DM: SHR-diabético; PC: peso corporal; FC: frequência cardíaca; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); DSVE: diâmetro sistólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; Índice MVE: índice de massa do VE; Esp. Rel. VE: espessura relativa do VE. Valor P: resultado do teste estatístico SHR-DM vs. SHR-CTL (teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney).

função diastólica mostrou redução da onda A e aumento da relação E/A e tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) no grupo SHR-DM. No entanto, a normalização do TRIV pela frequência cardíaca mostrou apenas tendência de aumento ($p=0,066$). Os valores da onda E mitral e do tempo de desaceleração da onda E (TDE) não diferiram entre os grupos.

Estudo Funcional do Músculo Isolado

A Tabela 6 apresenta os dados funcionais do músculo papilar obtidos em condição basal com concentração extracelular de cálcio de 1,25 mM. Observamos que o tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida (TPT) foi maior e a velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida ($+dT/dt$) menor no grupo diabético, mostrando alentecimento da função contrátil nesse grupo. A tensão desenvolvida (TD) foi menor no grupo diabético, no entanto não atingiu

Tabela 5. Análise ecocardiográfica das variáveis funcionais do coração ao final do período experimental

Variáveis	SHR-CTL (n=21)	SHR-DM (n=16)	Valor P
%Δ endo	45,8 ± 9,35	37,1 ± 8,94	0,005
Fração de Ejeção	0,83 ± 0,08	0,74 ± 0,11	0,005
VEPP (mm/s)	30,9 ± 7,10	26,4 ± 5,94	0,039
Onda E (cm/s)	77,1 ± 25,2	92,9 ± 30,4	0,090
Onda A (cm/s)	72,2 ± 37,1	34,4 ± 20,5	0,001
E/A	0,75 (0,62 - 4,37)	1,41 (1,19 - 6,43)	0,014
TRIV (ms)	36,9 ± 7,60	43,4 ± 6,44	0,008
TDE (ms)	38,1 ± 5,67	33,2 ± 7,09	0,132
TRIVn (MS)	84,5 ± 15,2	94,5 ± 17,4	0,066

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. SHR-CTL: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) - controle; SHR-DM: SHR-diabético; %Δ endo: porcentagem de encurtamento endocárdico do VE; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE; E/A: razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TDE: tempo de desaceleração da onda E; TRIVn: TRIV normalizado pela frequência cardíaca. Valor P: resultado do teste estatístico SHR-DM vs. SHR-CTL (teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney).

diferença estatística (p=0,121). Não observamos comprometimento do relaxamento miocárdico (-dT/dt) e da tensão de repouso no grupo diabético.

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

Variáveis	CTL (n=13)	DM (n=12)	Valor P
TD (g/mm ²)	5,60 (2,57 - 7,99)	3,05 (2,17 - 5,42)	0,121
TPT (ms)	236 ± 30,0	264 ± 24,2	0,024
+dT/dt (g/mm ² /s)	43,2 ± 22,5	25,7 ± 15,4	0,033
-dT/dt (g/mm ² /s)	19,5 ± 9,54	15,3 ± 6,96	0,229
TR (g/mm ²)	0,92 ± 0,37	0,81 ± 0,27	0,383

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. SHR-CTL: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) - controle; SHR-DM: SHR-diabético; TD: tensão desenvolvida; TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso. Valor P: resultado do teste estatístico SHR-DM vs. SHR-CTL (teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney).

Na Tabela 7 estão expostas as variáveis funcionais obtidas após manobra de pós-pausa. Os valores de TD e +dT/dt foram menores no grupo SHR-DM nas contrações após pausa de 10, 30 e 60 segundos. A manobra não mostrou diferença entre os grupos em relação aos índices TPT, -dT/dt e TR.

Tabela 7. Variáveis funcionais do músculo isolado obtidas em contrações isométricas em manobra de pós-pausa

	Seg.	TD (g/mm ²)	TPT (ms)	+dT/dt (g/mm ² /s)	-dT/dt (g/mm ² /s)	TR (g/mm ²)
SHR-CTL	PP" 10	6,13 ± 3,04	240 (220 - 250)	54,9 (25,0 - 70,9)	21,0 ± 10,2	0,95 ± 0,37
	PP" 30	6,75 ± 3,33	230 (225 - 260)	58,5 (27,5 - 80,7)	19,5 ± 9,54	0,93 ± 0,38
	PP" 60	6,89 ± 3,41	245 ± 41,7	58,5 (28,6 - 86,4)	22,9 ± 11,4	0,90 ± 0,36
SHR-DM	PP" 10	3,99 ± 2,21*	270 (245 - 270)	25,1 (13,7 - 43,5)*	16,0 ± 7,63	0,81 ± 0,30
	PP" 30	4,31 ± 2,54*	270 (253 - 285)	26,9 (13,9 - 48,8)*	15,3 ± 6,96	0,83 ± 0,36
	PP" 60	4,39 ± 2,66*	271 ± 30,8	27,7 (13,4 - 50,2)*	16,8 ± 8,54	0,82 ± 0,37

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. SHR-CTL: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) - controle; SHR-DM: SHR-diabético; PP: pós-pausa (segundos); TD: tensão desenvolvida; TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso. *: p<0,05 vs. SHR-CTL (comparação entre grupos com o mesmo tempo de pausa) (teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney).

Na Tabela 8 estão mostradas as variáveis funcionais obtidas sob manobra de elevação da concentração de cálcio extracelular. Os valores da TD, nas concentrações de cálcio de 1,25 e 2,5 mM, foram menores no grupo diabético em relação ao controle, não sendo diferente nas concentrações de 0,625 e 5,0 mM. Em relação ao TPT e +dT/dt, houve alentecimento contrátil do músculo nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5,0 mM. Os valores de -dT/dt e TR não se mostraram diferentes entre os grupos com a manobra de elevação de cálcio extracelular.

Tabela 8. Variáveis funcionais do músculo isolado obtidas em contrações isométricas em manobra de elevação da concentração de cálcio extracelular

	mM	TD (g/mm ²)	TPT (ms)	+dT/dt (g/mm ² /s)	-dT/dt (g/mm ² /s)	TR (g/mm ²)
SHR-CTL	0,625	3,75 (1,89 - 5,74)	233 ± 34,2	30,2 ± 15,8	15,6 ± 8,39	0,84 ± 0,31
	1,25	5,75 ± 2,62	230 (210 - 240)	48,2 ± 22,0	21,6 ± 10,1	0,84 ± 0,31
	2,5	7,06 ± 3,08	220 (210 - 230)	64,0 ± 30,6	25,1 ± 11,7	0,82 ± 0,29
	5,0	6,96 ± 3,07	218 ± 28,6	64,9 ± 31,8	24,3 ± 11,5	0,82 ± 0,29
SHR-DM	0,625	2,51 (1,04 - 3,40)	258 ± 32,8	18,8 ± 12,1	11,3 ± 5,78	0,73 ± 0,27
	1,25	3,59 ± 2,02*	250 (240 - 268)*	28,0 ± 16,9*	16,2 ± 8,48	0,72 ± 0,27
	2,5	4,64 ± 2,37*	250 (233 - 270)*	37,5 ± 21,3*	20,0 ± 9,16	0,74 ± 0,29
	5,0	4,78 ± 2,02	252 ± 27,9*	39,2 ± 19,5*	19,9 ± 7,30	0,76 ± 0,28

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. SHR-CTL: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) - controle; SHR-DM: SHR-diabético; TD: tensão desenvolvida; TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso. *: p<0,05 vs. SHR-CTL (comparação entre grupos com a mesma concentração de cálcio) (teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney).

Na Tabela 9 são apresentadas as variáveis funcionais obtidas em contrações isométricas após adição de isoproterenol a solução nutriente. A TD foi menor no grupo diabético em relação ao controle, nas concentrações de isoproterenol 10^{-7} e 10^{-6} M. Na concentração de 10^{-8} M não houve diferença significativa entre os grupos. A +dT/dt apresentou-se diminuída no grupo diabético nas concentrações de isoproterenol de 10^{-8} e 10^{-6} M, e sem diferença na concentração de 10^{-7} M. Em relação ao TPT, -dT/dt e TR, não houve diferença com a manobra de adição de isoproterenol.

Tabela 9. Variáveis funcionais do músculo isolado obtidas em contrações isométricas após adição de isoproterenol a solução nutriente

	M	TD (g/mm ²)	TPT (ms)	+dT/dt (g/mm ² /s)	-dT/dt (g/mm ² /s)	TR (g/mm ²)
SHR-CTL	ISO 10 ⁻⁸	5,48 ± 2,83	219 ± 30,7	48,0 ± 25,6	21,1 ± 11,2	0,74 ± 0,34
	ISO 10 ⁻⁷	5,43 ± 2,83	198 ± 31,9	56,2 (26,3 - 70,8)	24,6 ± 13,7	0,70 ± 0,31
	ISO 10 ⁻⁶	6,53 (2,78 - 7,98)	170 (165 - 190)	56,2 (30,8 - 91,0)	31,6 ± 17,7	0,69 ± 0,29
SHR-DM	ISO 10 ⁻⁸	3,53 ± 1,98	235 ± 27,5	29,2 ± 18,0*	16,0 ± 7,92	0,69 ± 0,30
	ISO 10 ⁻⁷	3,23 ± 1,82*	201 ± 23,1	27,7 (16,3 - 42,9)	17,3 ± 7,79	0,68 ± 0,29
	ISO 10 ⁻⁶	2,60 (1,82 - 4,06)*	185 (170 - 195)	27,7 (15,9 - 45,4)*	20,8 ± 11,7	0,66 ± 0,28

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. SHR-CTL: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) - controle; SHR-DM: SHR-diabético; ISO: isoproterenol; TD: tensão desenvolvida; TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso. *: p<0,05 vs. SHR-CTL (comparação entre grupos com a mesma concentração de isoproterenol) (teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney).

Características Morfométricas

As variáveis morfométricas dos animais estão expostas na Tabela 10. Os pesos do VE, ventrículo direito (VD) e átrios, em valores absolutos, foram menores no grupo SHR-DM. No entanto, após normalização para o peso corporal, os valores de VE e átrios deixaram de apresentar diferença estatística entre os grupos. O VD dos animais diabéticos continuou mostrando valores menores, mesmo após normalização para o peso corporal. As razões entre os pesos úmido e seco do VE, VD, átrios, pulmão e fígado não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A Tabela 11 mostra os valores relativos à concentração de hidroxiprolina, fração de colágeno intersticial e diâmetro do miócito do miocárdio do VE. Os valores obtidos não mostraram diferença significativa entre os grupos.

Tabela 10. Variáveis morfométricas dos animais

Variáveis	CTL (n=21)	DM (n=16)	Valor P
PC (g)	339 ± 38,3	277 ± 26,1	0,001
VE (g)	1,12 ± 0,16	0,87 ± 0,13	0,001
VE/PC (g/kg)	3,31 ± 0,46	3,16 ± 0,47	0,338
VD (g)	0,33 (0,26 - 0,43)	0,21 (0,18 - 0,23)	0,001
VD/PC (g/kg)	0,96 (0,77 - 1,32)	0,73 (0,65 - 0,84)	0,006
Átrios (g)	0,15 (0,12 - 0,23)	0,11 (0,09 - 0,14)	0,015
Átrios/PC (g/kg)	0,44 (0,35 - 0,65)	0,39 (0,31 - 0,56)	0,276
VE úmido/seco	4,11 (3,99 - 4,21)	4,05 (3,92 - 4,23)	0,519
VD úmido/seco	4,20 (3,40 - 4,34)	4,15 (3,78 - 4,43)	0,560
Átrios úmido/seco	4,52 ± 0,33	4,70 ± 0,43	0,161
Pulmão úmido/seco	4,90 ± 0,31	4,84 ± 0,25	0,532
Fígado úmido/seco	3,33 (3,18 - 3,46)	3,43 (3,36 - 3,51)	0,073

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. SHR-CTL: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) - controle; SHR-DM: SHR-diabético; PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito. Valor P: resultado do teste estatístico SHR-DM vs. SHR-CTL (teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney).

Tabela 11. Avaliação bioquímica e morfométrica do tecido miocárdico do ventrículo esquerdo

Variáveis	SHR-CTL (n=10)	SHR-DM (n=10)	Valor P
HOP VE (mg/g)	6,68 ± 1,52	7,27 ± 2,28	0,504
FCI (%)	9,00 ± 2,90	13,3 ± 7,60	0,113
Diâmetro do miócito (µm)	19,1 (17,0 - 22,4)	20,6 (19,6 - 21,0)	0,623

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. SHR-CTL: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) - controle; SHR-DM: SHR-diabético; HOP VE: concentração de hidroxiprolina no miocárdio do ventrículo esquerdo; FCI: fração de colágeno intersticial. Valor P: resultado do teste estatístico SHR-DM vs. SHR-CTL (teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney).

Avaliação do Estresse Oxidativo

Na Tabela 12 estão expostos os valores obtidos da avaliação do estresse oxidativo no soro. O hidroperóxido de lipídio apresentou-se elevado no grupo diabético, e as enzimas superóxido dismutase e glutathiona peroxidase mostraram-se diminuídas no grupo diabético.

Tabela 12. Avaliação do estresse oxidativo no soro

Variáveis	SHR-CTL (n=8)	SHR-DM (n=8)	Valor P
Hidroperóxido de lipídio (nmol/ml)	8,80 ± 0,84	11,1 ± 1,04	0,001
Superóxido dismutase (U/g proteína)	687 ± 84,2	396 ± 49,5	0,001
Glutathiona peroxidase (nmol/ml)	20,7 ± 1,98	17,6 ± 1,95	0,008

Valores expressos em média e desvio padrão. SHR-CTL: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) - controle; SHR-DM: SHR-diabético. Valor P: resultado do teste estatístico SHR-DM vs. SHR-CTL (teste *t* de Student).

Na Tabela 13 estão apresentados os valores obtidos da avaliação do estresse oxidativo no tecido miocárdico do VE. Observou-se elevação do hidroperóxido de lipídio nos animais diabéticos e sem diferença estatisticamente significativa quanto as enzimas superóxido dismutase e glutathiona peroxidase.

Tabela 13. Avaliação do estresse oxidativo no tecido miocárdico do ventrículo esquerdo

Variáveis	SHR-CTL (n=8)	SHR-DM (n=8)	Valor P
Hidroperóxido de lipídio (nmol/mg proteína)	224 ± 23,0	352 ± 45,2	0,001
Superóxido dismutase (nmol/mg proteína)	9,14 (7,28 - 9,72)	9,83 (8,54 - 0,32)	0,195
Glutathiona peroxidase (nmol/mg proteína)	40,0 ± 3,67	43,1 ± 11,3	0,475

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. SHR-CTL: ratos espontaneamente hipertensos (SHR) - controle; SHR-DM: SHR-diabético. Valor P: resultado do teste estatístico SHR-DM vs. SHR-CTL (teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney).

Discussão

Neste estudo avaliamos a influência do diabetes mellitus, induzido por estreptozotocina, sobre a remodelação ventricular e a atividade oxidativa em ratos senescentes espontaneamente hipertensos.

Sabe-se que ratos SHR desenvolvem precocemente hipertensão arterial e hipertrofia ventricular esquerda e a partir dos 18 meses são considerados senescentes (Trippodo et al., 1981; Anversa et al., 1984; Bing et al., 2002). Assim optamos pela indução do diabetes mellitus a partir dessa idade para avaliarmos os efeitos do diabetes em animais senescentes hipertensos, considerando a alta prevalência da concomitância dessas doenças em indivíduos idosos.

A aferição da pressão arterial e a realização do ecocardiograma no início do período experimental tiveram como objetivo assegurar que todos os animais apresentassem uniformidade dos níveis pressóricos e do acometimento cardíaco.

Foram realizadas a mensuração do consumo de água e ração, a determinação da glicemia e a avaliação do peso corporal dos animais, para a confirmação do estado diabético. Os animais pertencentes ao grupo SHR-DM apresentaram maior consumo de água e ração, glicemia acima de 220 mg/dL e ao final do período experimental apresentaram peso corporal menor em relação ao grupo SHR-CTL. Todos esses sinais são observados em animais diabéticos nesse modelo experimental (Babu & Srinivasan, 1999; Hakam et al., 2006; Hsi et al., 2009).

Em relação a pressão arterial, não observamos diferença entre os grupos, concordando com o estudo realizado por Wienen et al. (2001) em ratos SHR diabéticos. Dessa forma, consideramos que esse fator não foi responsável pelas diferenças encontradas no nosso estudo.

O ecocardiograma é um método muito útil na avaliação *in vivo* da estrutura e função do coração. No entanto, a função ventricular avaliada por esse método sofre influência da variabilidade das condições neurohormonais e de carga no momento da avaliação, da geometria da cavidade ventricular, além das

variações da frequência cardíaca (Opie, 2008). Por essa razão, alterações da função ventricular observadas ao ecocardiograma não indicam necessariamente mudanças na contratilidade miocárdica. Por outro lado, no estudo do músculo papilar não há influência das modificações neurohormonais e da geometria da cavidade, e as condições de carga e frequência cardíaca são controladas, permitindo avaliação mais adequada da contratilidade miocárdica e das propriedades ativas e passivas do miocárdio.

Por meio do ecocardiograma foram analisadas variáveis estruturais do coração e parâmetros das funções sistólica e diastólica do VE. Os resultados mostraram que o grupo diabético apresentou dilatação das câmaras cardíacas esquerdas, acompanhadas de disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, quando comparado ao grupo controle. O comprometimento das câmaras cardíacas pode ser evidenciado pelo aumento do diâmetro diastólico do VE normalizado pelo peso corporal e aumento do diâmetro sistólico do VE, além do maior diâmetro do átrio esquerdo normalizado pelo peso corporal. Como os animais diabéticos apresentaram peso corporal menor que os não diabéticos, os diâmetros diastólico do VE e do átrio esquerdo foram normalizados pelo peso, considerando que o tamanho do coração varia de acordo com o peso corporal. Esse procedimento pode trazer erros de interpretação dos resultados porque os diâmetros das cavidades cardíacas não são exatamente proporcionais ao peso corporal (Moreira et al., 2006). No entanto, em nosso estudo, apesar da diferença significativa do peso corporal entre os grupos, os valores absolutos dos diâmetros diastólico do VE e do átrio esquerdo não se mostraram diferentes. Portanto, podemos assumir que os animais diabéticos apresentaram dilatação do VE e do átrio esquerdo. Os nossos dados são concordantes com vários estudos da literatura em que o diabetes mellitus causou dilatação das câmaras cardíacas (Joffe et al., 1999; Mihm et al., 2001; Akula et al., 2003; Kim et al., 2010; Wang et al., 2010). As espessuras diastólicas da parede posterior do VE e do septo interventricular e a espessura relativa do VE foram menores no grupo diabético. Além disso, o índice de massa do VE, avaliado por ecocardiograma e no estudo

post-mortem, não foi diferente entre os grupos. Portanto, os nossos dados indicam remodelação ventricular do tipo excêntrica no grupo diabético. Essas alterações são observadas frequentemente na cardiomiopatia diabética, que pode resultar em disfunção ventricular (Boudina, 2009; Khavandi et al., 2009). O achado de dilatação ventricular sem hipertrofia cardíaca, observado no grupo diabético, pode ser decorrente de ativação de metaloproteinases da matriz extracelular do miocárdio. As metaloproteinases constituem uma família de enzimas com propriedades colagenolíticas presentes na matriz extracelular que podem ser ativadas por citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, entre outros. As metaloproteinases causam degradação da matriz extracelular o que leva a dilatação e adelgaçamento da parede da cavidade cardíaca, como resultado do realinhamento mural de fascículos miocíticos e/ou de miócitos individuais, com consequente disfunção ventricular (Spinale, 2002; Mann, 2008). Nessa condição, a disfunção ventricular sistólica deve-se ao aumento da pós-carga cardíaca (Opie, 2008).

O grupo SHR-DM também apresentou menor frequência cardíaca em relação ao grupo não diabético. Esse achado também tem sido observado com muita frequência por outros investigadores em modelo de diabetes mellitus induzido por estreptozotocina, em ratos normais (Mihm et al., 2001; Wang et al., 2010). Esse comportamento da frequência cardíaca está provavelmente relacionado as alterações causadas pelo diabetes no sistema nervoso simpático e parassimpático e na sensibilidade do nó sinusal (Foy & Lucas, 1978; Maeda et al., 1995; do Carmo et al., 2008; Boku et al., 2010). No entanto, não é possível descartar a influência de diferentes níveis de sedação sobre a frequência cardíaca, durante a realização do ecocardiograma. Além disso, a avaliação das funções sistólica e diastólica do VE pode ficar prejudicada quando os grupos de animais apresentam diferenças significativas da frequência cardíaca.

Os índices de função sistólica do VE mostraram-se comprometidos no grupo diabético, pois a porcentagem de encurtamento endocárdico, a fração de ejeção e a velocidade de encurtamento da parede posterior foram menores em

relação ao grupo controle. A função diastólica também apresentou-se alterada no grupo SHR-DM, sendo importante ressaltar que a redução significativa da onda A e o aumento da razão E/A indicam maior comprometimento da função diastólica nesse grupo. Em corações normais, a razão E/A é maior que 1,0, isto é, a onda E é maior que a onda A. Na fase de disfunção diastólica leve, ocorre redução da onda E e elevação da onda A e, habitualmente, a razão E/A é menor que 1,0. A medida que a disfunção diastólica avança, ocorre retorno da razão E/A ao padrão normal, denominada disfunção diastólica do tipo pseudonormal. Na fase de disfunção diastólica grave ocorre aumento mais acentuado da onda E e redução da onda A, aumentando a razão E/A (Nagueh et al., 2009). Portanto, fica evidente que o coração dos animais diabéticos estava em estágio mais avançado de comprometimento cardíaco. Muitos autores, igualmente, relataram em estudos com ratos diabéticos, prejuízo nas funções sistólica e diastólica do VE (Joffe et al., 1999; Mihm et al., 2001; Akula et al., 2003; Kim et al., 2010).

A análise da função do músculo papilar isolado mostrou que o grupo SHR-DM apresentou piora da função cardíaca na condição basal e após manobras para avaliação da reserva contrátil. Pode-se observar na condição basal, que o TPT foi maior e a $+dT/dt$ foi menor no grupo diabético. Da mesma forma, Wold et al. (2001), em seu estudo para caracterizar a função contrátil da cardiomiopatia diabética hipertensiva em miócitos ventriculares de ratos adultos, mostrou maior TPT e menor $+dT/dt$ no grupo hipertenso diabético. Aragno et al. (2008) observaram, em músculos papilares de ratos Wistar diabéticos, comprometimento da função miocárdica em condição basal (menor TD, $+dT/dt$, $-dT/dt$), porém sem diferença significativa no TPT. Borges et al. (2006), utilizando-se de modelo de diabetes em ratos Wistar, mostraram diminuição significativa dos índices de contração ($+dP/dt_{max}$) e relaxamento ($-dP/dt_{max}$) em animais não sedados. Por outro lado, Kim et al. (2010) não observaram diferença nesses índices obtidos de ratos Sprague-Dawley diabéticos anestesiados, embora tenham encontrado comprometimento do índice contrátil relação pressão-volume sistólica final.

Nas manobras de pós-pausa a TD e a $+dT/dt$ apresentaram-se menores no grupo SHR-DM, em todos os momentos. Nas manobras de elevação da concentração de cálcio, a TD foi menor no grupo diabético, nas concentrações de 1,25 e 2,5 mM. O TPT mostrou-se maior e a $+dT/dt$ menor no grupo SHR-DM em relação ao grupo SHR-CTL, nas concentrações de cálcio de 1,25, 2,5 e 5,0 mM. Após a adição em solução nutriente do estimulador β -adrenérgico isoproterenol, o grupo diabético também apresentou piora da função cardíaca em comparação com controle. A TD foi menor nas concentrações de ISO 10^{-7} e ISO 10^{-6} e a $+dT/dt$ diminuiu nas concentrações de ISO 10^{-8} e ISO 10^{-6} . Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Aragno et al. (2008) que relataram resposta diminuída de músculos papilares de ratos Wistar diabéticos à estimulação β -adrenérgica.

Portanto, o nosso estudo em ratos senescentes e os da literatura em ratos adultos jovens mostram comprometimento funcional do coração e do miocárdio causado por diabetes mellitus, tanto em ratos hipertensos quanto em normotensos. Os nossos resultados do estudo do músculo papilar mostram que há comprometimento da contratilidade miocárdica em animais SHR diabéticos. Esse comprometimento miocárdico, de forma isolada ou conjuntamente com a remodelação ventricular excêntrica, poderia explicar a redução da função ventricular observada por ecocardiografia em SHR diabéticos.

Para avaliar se a co-existência de hipertensão arterial e diabetes mellitus resulta em maior prejuízo da função contrátil cardíaca, Wold et al. (2001) estudaram os efeitos do diabetes sobre a função de miócitos isolados de ratos adultos normotensos (Wistar-Kyoto) e hipertensos (SHR). Os autores observaram comprometimento da função contrátil e de relaxamento nos animais SHR em relação aos Wistar-Kyoto, que se acentuou nos SHR diabéticos.

As variáveis morfométricas analisadas mostraram que o coração dos animais do grupo diabético apresentou peso menor, como observado nos valores de VE, VD e átrios. Porém, quando esses valores foram normalizados pelo peso corporal, não houve diferença significativa, com exceção do peso de VD que

permaneceu menor no grupo diabético. No estudo de Wang et al. (2010), ratos Wistar com diabetes apresentaram diminuição do peso do coração, porém quando o peso do coração foi normalizado pelo peso corporal, o peso foi maior no grupo diabético.

Além disso, foi possível verificar que não houve diferença entre os grupos em relação ao peso úmido/peso seco dos ventrículos, átrios, pulmão e fígado.

As avaliações de colágeno pelas técnicas de hidroxiprolina e por lâminas coradas por *picrosirius red* não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Nossos resultados são concordantes com aqueles obtidos por Pijl et al. (1994) em um estudo sobre os efeitos da hipertensão e do diabetes em ratos. Cosyns et al. (2008) também não encontraram diferença na quantidade de colágeno em um estudo com ratos Wistar diabéticos. Apesar de não termos observado diferença significativa entre os grupos na quantidade de colágeno miocárdico, tanto o grupo diabético como o controle apresentaram elevada taxa de fibrose em relação aos dados da literatura, obtidos de ratos normotensos adultos jovens (Aiello et al., 2004; Levick et al., 2009; Oliveira et al., 2009). Os nossos resultados indicam, portanto, que a hipertensão e o envelhecimento são fatores importantes no aumento do colágeno miocárdico (Eghbali et al., 1989; Lakhan & Harle, 2008; Shahbaz et al., 2010), e o diabetes não apresenta influência significativa.

No estudo histológico do tecido miocárdico corado por hematoxilina e eosina não observamos diferença significativa entre os grupos na mensuração do diâmetro dos miócitos. O grupo SHR-DM mostrou apenas uma tendência de maior hipertrofia em relação ao grupo SHR-CTL. A hipertrofia do miócito constitui achado frequente na cardiomiopatia diabética, porém, no modelo de diabetes induzido por estreptozotocina, provavelmente em decorrência da hipoinsulinemia, a hipertrofia miocárdica não tem sido habitualmente observada (Poornima et al., 2006; Maalouf, et al., 2009).

Sabe-se que os danos causados tanto pelo diabetes como pela hipertensão têm sido associados ao aumento do estresse oxidativo (Paravicini & Touyz, 2008). Vários autores têm relatado o aumento do estresse oxidativo no coração de ratos diabéticos (Aragno et al., 2008; Timir et al., 2010; Wang et al., 2010). Em nosso estudo, a análise da atividade oxidativa no soro mostrou que no grupo SHR-DM houve aumento do hidroperóxido de lipídio e diminuição das enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase. No tecido miocárdico, o hidroperóxido de lipídio apresentou-se elevado no grupo diabético, e as enzimas antioxidantes não se mostraram diferentes entre os grupos. O aumento da atividade pró-oxidante e a significativa diminuição de enzimas antioxidantes têm sido mostrados contribuir para o estresse oxidativo em diabetes. Kaul et al. (1996) relataram aumento da peroxidação lipídica e diminuição na atividade da superóxido dismutase e da glutathione peroxidase no coração de animais diabéticos. Contudo, Fordaliso et al. (2007), no estudo com ratos hipertensos com diabetes, não encontraram efeito aditivo dessas duas comorbidades na produção de espécies reativas de oxigênio.

A complexa e multifatorial natureza das perturbações celulares e moleculares do diabetes mellitus que alteram a estrutura e função cardíaca, permanece não completamente esclarecida na literatura (Poornima et al., 2006; Okoshi et al., 2007; Wang et al., 2010).

Os mecanismos prováveis que estão envolvidos na diminuição da contratilidade miocárdica no diabetes mellitus são: comprometimento na homeostase do cálcio, ativação do sistema renina-angiotensina, aumento do estresse oxidativo, alteração no metabolismo do substrato e disfunção mitocondrial (Boudina & Abel, 2007).

O íon cálcio intracelular é o maior regulador da contratilidade cardíaca, e os fatores pelos quais o comprometimento de sua homeostase altera a função em diabetes incluem a redução da atividade das ATPases (Zhao et al., 2006), a diminuição da atividade do retículo sarcoplasmático no transporte e estoque de cálcio e a redução da atividade de outros trocadores como o sódio-

cálcio (Pierce & Dhalla, 1981; Lopaschuk et al., 1983). Em corações de animais com diabetes induzido por estreptozotocina têm sido encontrado reduzida expressão e atividade da SERCA2a, reduzida expressão do trocador sódio-cálcio, prejudicada liberação e recaptura de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e comprometimento mitocondrial (Lopaschuk et al., 1983; Flarsheim et al., 1996; Hattori et al., 2000; Choi et al., 2002; Zhao et al., 2006; Suarez et al., 2008).

A ativação do sistema renina-angiotensina no diabetes mellitus parece ter papel importante na patogênese da cardiomiopatia diabética. A densidade dos receptores de angiotensina II e a sua expressão gênica estão elevadas no coração diabético (Khatter et al., 1996; Fiordaliso et al., 2000). A ativação do sistema renina-angiotensina no diabetes mellitus tem sido associada ao aumento dos danos oxidativos, apoptose e necrose de células endoteliais e cardiomiócitos (Frustaci et al., 2000), contribuindo para o aumento da fibrose intersticial. O bloqueio do sistema renina-angiotensina tem mostrado efeitos benéficos em animais diabéticos como restauração das funções do retículo sarcoplasmático, redução na produção das espécies reativas de oxigênio, redução de apoptose e fibrose e atenuação da disfunção cardíaca (Brown et al., 1997; Singh et al., 2008; Fiordaliso et al., 2006; Liu et al., 2006; Yaras et al., 2007).

A produção de espécies reativas de oxigênio constitui importante fator para o desenvolvimento e progressão da cardiomiopatia diabética (Cai, 2006; Cai et al., 2006). Estudos utilizando corações de animais diabéticos têm revelado ao nível celular, aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio, elevada produção de superóxido, aumento na expressão da NADPH oxidase e índices diminuídos de glutathione oxidada e reduzida (Ghosh et al., 2004; Ghosh et al., 2005; Ceylan-Isik et al., 2006; Lashin et al., 2006; Wold et al., 2006; Singh et al., 2008). O aumento do estresse oxidativo tem papel crítico em várias vias envolvidas na patogênese da cardiomiopatia diabética, incluindo lipotoxicidade, morte celular por apoptose e necrose e lesão tissular, bem como em alterações mitocondriais causando perda de eficiência energética do coração (Barouch et al., 2003; Kwon et al., 2003; Boudina & Abel, 2007). Estratégias de redução de

espécies reativas de oxigênio, como aumento da expressão de metalotioneína, catalase e superóxido dismutase, têm revertido a disfunção cardíaca em modelos animais de diabetes tipo 1 e 2 (Ye et al., 2004; Cai et al., 2006; Matsushima et al., 2006; Shen et al., 2006). Em nosso grupo, a utilização do antioxidante quercetina reduziu a atividade oxidativa e melhorou a função ventricular e miocárdica de ratos Wistar diabéticos (Okoshi et al., 2010).

Outro importante contribuinte para o desenvolvimento da cardiomiopatia diabética é a alteração miocárdica no metabolismo energético e do substrato (Lopaschuk, 2002; Taegtmeyer et al., 2002). O diabetes é caracterizado por estado de redução no metabolismo de glicose e lactato e aumento no metabolismo de ácidos graxos. O aumento de ácidos graxos livres estimula a sinalização dos receptores α ativados por proliferador do peroxissoma (PPAR α), com consequente transcrição de vários genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos (Finck et al., 2002; Finck et al., 2003). Os ácidos graxos oxidados causam elevação na produção de espécies reativas de oxigênio que podem promover lipotoxicidade e consequente disfunção miocárdica (Sharma et al., 2004; McGavock et al., 2006). Além disso, lipídeos intermediários como a ceramida podem promover apoptose dos cardiomiócitos (Zhou et al., 2000), contribuindo para o comprometimento miocárdico do diabetes.

Por fim, recentes estudos têm relatado papel da disfunção mitocondrial na patogênese da cardiomiopatia diabética (Russell et al., 2004; An & Rodrigues, 2006; Boudina & Abel, 2006). As avaliações da atividade mitocondrial no diabetes tipo 1 têm mostrado, além da redução da fosforilação oxidativa (Savabi, 1988; Awaji et al., 1990), menor atividade da creatina fosfato, menor atividade da síntese de ATP (Pierce & Dhalla, 1985) e menor respiração mitocondrial estimulada por creatina (Veksler et al., 1991). Estas alterações contribuem para a disfunção miocárdica por reduzirem a produção de ATP e, consequentemente, com a reserva miocárdica de fosfatos de alta energia.

O nosso estudo mostra que, mesmo em coração de ratos idosos com intensa remodelação causada pela hipertensão arterial sistêmica ao longo de vários meses, o diabetes mellitus é capaz de induzir alterações adicionais na estrutura e função cardíaca. Além disso, este estudo também mostra associação entre remodelação cardíaca e aumento do estresse oxidativo.

Conclusão

O diabetes mellitus causa dilatação das câmaras cardíacas esquerdas e piora a função ventricular e miocárdica em ratos senescentes espontaneamente hipertensos, e estas alterações estão associadas a aumento do estresse oxidativo.

Referências Bibliográficas

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

Aiello EA, Villa-Abrille MC, Escudero EM, Portiansky EL, Pérez NG, de Hurtado MC, et al. Myocardial hypertrophy of normotensive Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:1229-35.

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

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.

An D, Rodrigues B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:1489-506.

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.

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

Assmann G, Schulte H. Diabetes mellitus and hypertension in the elderly: concomitant hyperlipidemia and coronary heart disease risk. *Am J Cardiol* 1989;63:33-7.

Awaji Y, Hashimoto H, Matsui Y, Kawaguchi K, Okumura K, Ito T, et al. Isoenzyme profiles of creatine kinase, lactate dehydrogenase, and aspartate aminotransferase in the diabetic heart: comparison with hereditary and catecholamine cardiomyopathies. *Cardiovasc Res* 1990;24:547-54.

Babatsikou F, Zavitsanou A. Epidemiology of hypertension in the elderly. *Health Sci J* 2010;4:24-30.

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.

Barouch LA, Berkowitz DE, Harrison RW, O'Donnell CP, Hare JM. Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice. *Circulation* 2003;108:754-9.

Bing OH, Brooks WW, Robinson KG, Slawsky MT, Hayes JA, Litwin SE, et al. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:383-96.

Bing OH, Conrad CH, Boluyt MO, Robinson KG, Brooks WW. Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *Heart Fail Rev* 2002;7:71-88.

Boku A, Sugimura M, Morimoto Y, Hanamoto H, Niwa H. Hemodynamic and autonomic response to acute hemorrhage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 2010;9:78-91.

Borges GR, de Oliveira M, Salgado HC, Fazan R Jr. Myocardial performance in conscious streptozotocin diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 2006;5:26-33.

Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Rev Endocr Metab Disord* 2010;11:31-9.

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

Boudina S, Abel ED. Mitochondrial uncoupling: a key contributor to reduced cardiac efficiency in diabetes. *Physiology (Bethesda)* 2006;21:250-8.

Brown L, Wall D, Marchant C, Sernia C. Tissue-specific changes in angiotensin II receptors in streptozotocin-diabetic rats. *J Endocrinol* 1997;154:355-62.

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

Cai L. Suppression of nitrative damage by metallothionein in diabetic heart contributes to the prevention of cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med* 2006;41:851-61.

Cai L, Wang Y, Zhou G, Chen T, Song Y, Li X, et al. Attenuation by metallothionein of early cardiac cell death via suppression of mitochondrial oxidative stress results in a prevention of diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1688-97.

Cesarino CB, Cipullo JP, Martin JFV, Ciorlia LA, de Godoy MRP, Cordeiro JA, et al. Prevalência e fatores sociodemográficos em hipertensos de São José do Rio Preto. *Arq Bras Cardiol* 2008;91:31-5.

Ceylan-Isik AF, Wu S, Li Q, Li SY, Ren J. High-dose benfotiamine rescues cardiomyocyte contractile dysfunction in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Appl Physiol* 2006;100:150-6.

Choi KM, Zhong Y, Hoit BD, Grupp IL, Hahn H, Dilly KW, et al. Defective intracellular Ca(2+) signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:1398-408.

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.

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling - concepts and clinical implications: a consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:569-82.

Conrad CH, Brooks WW, Robinson KG, Bing OH. Impaired myocardial function in spontaneously hypertensive rats with heart failure. *Am J Pathol* 1991;260:136-45.

- Cosyns B, Droogmans S, Hernot S, Degallier C, Garbar C, Weytjens C, et al. Effect of streptozotocin-induced diabetes on myocardial blood flow reserve assessed by myocardial contrast echocardiography in rats. *Cardiovasc Diabetol* 2008;7:26-35.
- 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.
- de 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;284:2242-6.
- de Simone G, Devereux RB, Camargo MJ, Volpe M, Wallerson DC, Atlas SA, et al. In vivo left ventricular anatomy in rats with two-kidney, one clip and one-kidney, one clip renovascular hypertension. *J Hypertens* 1992;10:725-32.
- de Souza AR, Costa A, Nakamura D, Mocheti LN, Stevanato Filho PR, Ovando LA. A study on systemic hypertension in the city of Campo Grande, MS, Brazil. *Arq Bras Cardiol* 2007;88:388-92.
- do Carmo JM, Hall JE, da Silva AA. Chronic central leptin infusion restores cardiac sympathetic-vagal balance and baroreflex sensitivity in diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:1974-81.
- Díez J, Frohlich ED. A translational approach to hypertensive heart disease. *Hypertension* 2010;55:1-8.
- Eghbali M, Eghbali M, Robinson TF, Seifter S, Blumenfeld OO. Collagen accumulation in heart ventricles as a function of growth and aging. *Cardiovasc Res* 1989;23:723-9.
- 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.
- Fein FS, Capasso JM, Aronson RS, Cho S, Nordin C, Miller-Green B, et al. Combined renovascular hypertension and diabetes in rats: a new preparation of congestive cardiomyopathy. *Circulation* 1984;70:318-30.

Fein FS, Cho S, Zola BE, Miller B, Factor SM. Cardiac pathology in the hypertensive diabetic rat. Biventricular damage with right ventricular predominance. *Am J Pathol* 1989;134:1159-66.

Fein FS, Strobeck JE, Malhotra A, Scheuer J, Sonnenblick EH. Reversibility of diabetic cardiomyopathy with insulin in rats. *Circ Res* 1981;49:1251-61.

Fein FS, Zola BE, Malhotra A, Cho S, Factor SM, Scheuer J, et al. Hypertensive-diabetic cardiomyopathy in rats. *Am J Pathol* 1990;258:793-805.

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.

Finck BN, Han X, Courtois M, Amond F, Nerbonne JM, Kovacs A, et al. A critical role for PPARalpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1226-31.

Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, et al. The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2002;109:121-30.

Fiordaliso F, Cuccovillo I, Bianchi R, Bai A, Doni M, Salio M, et al. Cardiovascular oxidative stress is reduced by an ACE inhibitor in a rat model of streptozotocin induced diabetes. *Life Sci* 2006;79:121-9.

Fiordaliso F, De Angelis N, Bai A, Cuccovillo I, Salio M, Serra DM, et al. Effect of beta-adrenergic and renin-angiotensin system blockade on myocyte apoptosis and oxidative stress in diabetic hypertensive rats. *Life Sci* 2007;81:951-9.

Fiordaliso F, Li B, Latini R, Sonnenblick EH, Anversa P, Leri A, et al. Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats is angiotensin II- dependent. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 2000;80:513-27.

Flarsheim CE, Grupp IL, Matlib MA. Mitochondrial dysfunction accompanies diastolic dysfunction in diabetic rat heart. *Am J Physiol* 1996;271:192-202.

Foy JM, Lucas PD. Comparison between spontaneously beating atria from control and streptozocin-diabetic rats. *J Pharm Pharmacol* 1978;30:558-62.

Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, et al. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res* 2000;87:1123-32.

Gersh BJ, Sliwa K, Mayosi BM, Yusuf S. Novel therapeutic concepts: the epidemic of cardiovascular disease in the developing world: global implications. *Eur Heart J* 2010;31:642-8.

Ghosh S, Pulinilkunnil T, Yuen G, Kewalramani G, An D, Qi D, et al. Cardiomyocyte apoptosis induced by short-term diabetes requires mitochondrial GSH depletion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:768-76.

Ghosh S, Ting S, Lau H, Pulinilkunnil T, An D, Qi D, et al. Increased efflux of glutathione conjugate in acutely diabetic cardiomyocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 2004;82:879-87.

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. Does increased oxidative stress cause hypertension? *Diabetes Care* 2008;31 suppl 2:S185-9.

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, Okoshi MP, Padovani CR, Aragon FF, Cicogna AC. Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to calcium cycling and beta-adrenergic system changes. *Nutr Res* 2003;23:911-9.

Hakam AC, Siddiqui AH, Hussain T. Renal angiotensin II AT2 receptors promote natriuresis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:503-8.

Hattori Y, Matsuda N, Kimura J, Ishitani T, Tamada A, Gando S, et al. Diminished function and expression of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger in diabetic rats: implication in Ca²⁺ overload. *J Physiol* 2000;527:85-94.

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

His SC, Kao YP, Wang PY, Chao HM, Huang CH, Liu HS, et al. Grape seed procyanidins improve diabetic symptoms in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Open Physiol J* 2009;2:6-13.

Hypertension in Diabetes Study (HDS): II. Increased risk of cardiovascular complications in hypertensive type 2 diabetic patients. *J Hypertens* 1993;11:319-25.

Izzo JL Jr, Gradman AH. Mechanisms and management of hypertensive heart disease: from left ventricular hypertrophy to heart failure. *Med Clin North Am* 2004;88:1257-71.

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.

Joffe II, Travers KE, Perreault-Micale CL, Hampton T, Katz SE, Morgan JP, et al. Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetic rat: noninvasive assessment with doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:2111-9.

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

Ker JA. The heart in diabetes. *S Afr J Diabetes Vasc Dis* 2010;7:48-9.

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

Khatter JC, Sadri P, Zhang M, Hoeschen RJ. Myocardial angiotensin II (Ang II) receptors in diabetic rats. *Ann N York Acad Sci* 1996;793:466-72.

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.

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

Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentrationdependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:615-21.

Lakhan SE, Harle L. Cardiac fibrosis in the elderly, normotensive athlete: case report and review of the literature. *Diagn Pathol* 2008;3:12-6.

Lashin OM, Szweda PA, Szweda LI, Romani AM. Decreased complex II respiration and HNE-modified SDH subunit in diabetic heart. *Free Radic Biol* 2006;40:886-96.

Levick SP, McLarty JL, Murray DB, Freeman RM, Carver WE, Brower GL. Cardiac mast cells mediate left ventricular fibrosis in the hypertensive rat heart. *Hypertension* 2009;53:1041-7.

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.

Liu X, Suzuki H, Sethi R, Tappia PS, Takeda N, Dhalla NS. Blockade of the renin-angiotensin system attenuates sarcolemma and sarcoplasmic reticulum remodeling in chronic diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1084:141-54.

Lopaschuk GD. Metabolic abnormalities in the diabetic heart. *Heart Fail Rev* 2002;7:149-59.

Lopaschuk GD, Tahiliani AG, Vadlamudi RV, Katz S, McNeill JH. Cardiac sarcoplasmic reticulum function in insulin- or carnitine-treated diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1983;245:969-76.

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.

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.

Maeda CY, Fernandes TG, Timm HB, Irigoyen MC. Autonomic dysfunction in short-term experimental diabetes. *Hypertension* 1995;26:1100-4.

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.

Mann DL. Pathophysiology of heart failure. In: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Braunwald E, eds. *Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2008. p. 541-60.

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;279:1534-9.

Matsushima S, Kinugawa S, Ide T, Matsusaka H, Inoue N, Ohta Y, et al. Overexpression of glutathione peroxidase attenuates myocardial remodeling and preserves diastolic function in diabetic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:2237-45.

McGavock JM, Victor RG, Unger RH, Szczepaniak LS. Adiposity of the heart, revisited. *Ann Intern Med* 2006;144:517-24.

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

Moreira VO, Castro AVB, 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.

Nagueh SF, Appleton CP, Gillebert TC, Marino PN, Oh JK, Smiseth OA, et al. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2009;22:107-33.

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

Ogochukwu AM, Victoria UC. A Review of anti-hypertension therapies in diabetic patients. *J Basic Clin Pharm* 2010;1:139-45.

Oliveira SA Jr, Okoshi K, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Campos DH, Martinez PF, et al. Nutritional and cardiovascular profiles of normotensive and hypertensive rats kept on a high fat diet. *Arq Bras Cardiol* 2009;93:526-33.

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, Guimarães JFC, Di Muzio BP, Fernandes AAH, Okoshi MP. Miocardiopatía diabética. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007;51:160-7.

Okoshi K, Ribeiro HB, Okoshi MP, Matsubara BB, Gonçalves G, Barros R, Cicogna AC. Improved systolic ventricular function with normal myocardial mechanics in compensated cardiac hypertrophy. *Jpn Heart J* 2004;45:647-56.

Okoshi MP, Xavier NP, Rosa CM, Fernandes AAH, Campos DHS, Cezar MDM, et al. Antioxidant quercetin reduces oxidative stress and ameliorates myocardial and ventricular function of diabetic rats. *Eur Heart J* 2010;31:568.

Okoshi MP, Okoshi K, Dal Pai V, Dal Pai-Silva M, Matsubara LS, Cicogna AC. Mechanical, biochemical, and morphological changes in the heart from chronic food restricted rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2001;79:754-60.

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 hypertensive rats. *Nutr Res* 2006;26:567-72.

Opie LH. Mechanisms of cardiac contraction and relaxation. In: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Braunwald E, eds. *Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2008. p. 509-39.

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

Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 2008;31 suppl 2:S170-80.

Patel Timir B, Patel LD, Patel Tejas B, Makwana Sunil H, Patel Tushar R. Effects of atorvastatin as antioxidants in diabetic associated cardiovascular complications. *J Pharm Sci & Res* 2010;2:247-56.

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.

Pierce GN, Dhalla NS. Cardiac myofibrillar ATPase activity in diabetic rats. *J Mol Cell Cardiol* 1981;13:1063-9.

Pierce GN, Dhalla NS. Heart mitochondrial function in chronic experimental diabetes in rats. *Can J Cardiol* 1985;1:48-54.

Pijl AJ, van der Wal AC, Mathy MJ, Kam KL, Hendriks MG, Pfaffendorf M, et al. Streptozotocin-induced diabetes mellitus in spontaneously hypertensive rats: a

pathophysiological model for the combined effects of hypertension and diabetes. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1994;32:225-33.

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

Ren J, Bode AM. Altered cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes from spontaneously diabetic BB rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:238-44.

Rodgers RL, Davidoff AJ, Mariani MJ. Cardiac function of the diabetic renovascular hypertensive rat: effects of insulin and thyroid hormone treatment. *Can J Physiol Pharmacol* 1991;69:346-54.

Rosário TM, Scala LCNS, França GVA, Pereira MRG, Jardim PCBV. Prevalência, controle e tratamento da hipertensão arterial sistêmica em Nobres, MT. *Arq Bras Cardiol* 2009;93:672-8.

Russell LK, Mansfield CM, Lehman JJ, Kovacs A, Courtois M, Saffitz JE, et al. Cardiac specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ Res* 2004;94:525-33.

Russo C, Olivieri O, Girelli D, Faccini G, Zenari ML, Lombardi S, et al. Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 1998;16:1267-71.

Savabi F. Mitochondrial creatine phosphokinase deficiency in diabetic rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;154:469-75.

Shahbaz AU, Sun Y, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Gerling IC, McGee JE, et al. Fibrosis in hypertensive heart disease: molecular pathways and cardioprotective strategies. *J Hypertens* 2010;28 suppl 1:S25-32.

Sharma S, Adroque JV, Golfman L, Uray I, Lemm J, Youker K, et al. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J* 2004;18:1692-700.

Shen X, Zheng S, Metreveli NS, Epstein PN. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 2006;55:798-805.

Singh VP, Le B, Khode R, Baker KM, Kumar R. Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. *Diabetes* 2008; 57:3297-306.

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

Souza MFM, Alencar AP. Mortalidade por doença cardiovascular no Brasil. In: Serrano CV Jr, Timerman A, Stefanini, eds. *Tratado de Cardiologia Socesp*. 2ª ed. São Paulo: Manole; 2009. p. 17-26.

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

Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002;90:520-30.

Suarez J, Scott B, Dillmann WH.. Conditional increase in SERCA2a protein is able to reverse contractile dysfunction and abnormal calcium flux in established diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 295:1439-45.

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

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

Taegtmeyer H, McNulty P, Young ME. Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes, part I: general concepts. *Circulation* 2002;105:1727-33.

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

Veksler VI, Murat I, Ventura-Clapier R. Creatine kinase and mechanical and mitochondrial functions in hereditary and diabetic cardiomyopathies. *Can J Physiol Pharmacol* 1991;69:852-8.

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* 2010 Oct 15. [Epub ahead of print].

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.

Wold LE, Relling DP, Colligan PB, Scott GI, Hintz KK, Ren BH, et al. Characterization of contractile function in diabetic hypertensive cardiomyopathy in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1719-26.

Wold LE, Ceylan-Isik AF, Fang CX, Yang X, Li SY, Sreejayan N, et al. Metallothionein alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin induced diabetes: role of Ca²⁺ cycling proteins, NADPH oxidase, poly(ADP-Ribose) polymerase and myosin heavy chain isozyme. *Free Radic Biol Med* 2006;40:1419-29.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27:1047-53.

World Health Organization. Global burden disease. www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf (acesso: 16/08/2010).

Yaras N, Bilginoglu A, Vassort G, Turan B. Restoration of diabetes induced abnormal local Ca²⁺ release in cardiomyocytes by angiotensin II receptor blockade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:912-20.

Ye G, Metreveli NS, Donthi RV, Xia S, Xu M, Carlson EC, et al. Catalase protects cardiomyocyte function in models of type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes* 2004;53:1336-43.

Zhao XY, Hu SJ, Li J, Mou Y, Chen BP, Xia Q. Decreased cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity contributes to cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Physiol Biochem* 2006;62:1-8.

Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, et al. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1784-9.