Paula Lázara Cruz

Ação do resveratrol sobre proteoglicanos de membrana presentes no músculo cardíaco em modelo animal de cardiomiopatia diabética

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Profa. Dra. Elia Garcia Caldini

São Paulo
2016

Paula Lázara Cruz

Ação do resveratrol sobre proteoglicanos de membrana presentes no músculo cardíaco em modelo animal de cardiomiopatia diabética

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Profa. Dra. Elia Garcia Caldini

São Paulo
2016

Versão Corrigida
A versão original encontra-se na FMUSP

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cruz, Paula Lázara

Ação do resveratrol sobre proteoglicanos de membrana presentes no músculo cardíaco em modelo animal de cardiomiopatia diabética / Paula Lázara Cruz. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Elia Tamaso Espin Garcia Caldini.

Descritores: 1.Diabetes Mellitus 2.Resveratrol 3.Cardiomiopatias diabéticas 4.Sistema nervoso autônomo/fisiopatologia 5.Proteoglicanos 6.Doenças cardiovasculares 7.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-325/16

Dedico este trabalho ao meu marido Cleiton Fagundes Machado que sempre me incentivou e me serviu de exemplo.

Obrigada, por sua ajuda, carinho e paciência.

Agradecimentos

Agradeço a professora Dra Elia Garcia Caldini pela oportunidade, carinho, palavras de incentivo e orientação dada.

A professora Dra Maria Claudia Costa Irigoyen por me ensinar a fazer pesquisa. Seus conselhos, apoio e principalmente confiança foram essenciais para a conclusão desse trabalho.

À Dra Célia Strunz, pelas discussões em torno do meu trabalho e auxílio durante esse período.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Hipertensão Experimental do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Saibam que vocês me ajudaram muito nessa jornada, sou muito grata a todos vocês.

Aos amigos Jacqueline Freire Machi, Katia Scapini, Oscar Albuquerque, Silvia Cavasin e Isabel Lameirinhas que tanto me ajudaram durante o meu projeto.

Ao amigo Edson Dias Moreira que sempre me incentivou com suas mais sinceras palavras, dentre elas: “O difícil a gente faz na hora e o impossível demora um pouquinho mais”.

Às amigas Alessandra Roggerio e Ana Paula Pacanaro e aos funcionários do Laboratório de Analises Clínicas do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela atenção e cuidados prestados durante o meu projeto.

Aos amigos Adão Caetano Sobrinho, Maria Cecília Lobo Marcondes e Marcelo Alves Ferreira, pela divisão de seus conhecimentos comigo.

Aos profissionais responsáveis pela Divisão de Experimentação e do Biotério do InCor, pelo carinho e prestatividade.

À profa. Dra. Katia de Angelis, a Dra. Ivana Cinthia de Moraes da Silva e Dra. Iris Callado Sanches, que compuseram a Comissão Examinadora da Qualificação por todas as sugestões e leitura cuidadosa.

Aos funcionários da Secretária do Programa Fisiopatologia Experimental, Vanda de Fátima Olivieri Mariscal e Igor Alexei Tolgyesi, que sempre me auxiliaram com muito carinho.

A professora Vera Salemi e ao Marcelo Dantas Tavares de Melo por toda atenção e no auxilio com os ecocardiogramas.

À Universidade de São Paulo e todos os professores, coordenadores, secretários e funcionários que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

A FAPESP pelo suporte financeiro ao projeto.

A minha família pelo carinho e compreensão e em especial ao meu marido Cleiton Fagundes Machado por tudo.

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

"Ter acesso ao conhecimento é um direito de todos; transmitir conhecimento é um dever de quem o possui".

Claudio Crow Quintino

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 Fisiopatologia do Diabetes **2**

1.2 Epidemiologia **4**

1.3 Cardiomiopatia Diabética **4**

1.4 Controle Autonômico **5**

1.5 Modelos experimentais de diabetes **6**

1.6 Glicosaminoglicanos e Proteoglicanos **8**

1.7 Fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF2) **10**

1.8 Resveratrol **10**

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS 14

3 MATERIAIS E MÉTODOS 16

3.1 Animais **17**

3.2 Sequência Experimental **18**

3.3 Indução ao diabetes experimental **19**

3.4 Administração do resveratrol **20**

3.5 Monitoramento dos níveis de glicose e triglicérides **20**

3.6 Coletas de sangue retro-orbital para dosagem de insulina **21**

3.7 Ecocardiografia **22**

3.8 Índice de Lee **23**

3.9 Cirurgia de canulação **23**

3.10 Registros da pressão arterial e frequência cardíaca de repouso **25**

3.11 Sensibilidade dos pressorreceptores **26**

3.12 Avaliação da modulação autonômica cardiovascular no domínio do tempo e da frequência (analise espectral) **28**

3.13 Avaliação de resistência a insulina **29**

3.14 Eutanásia e processamento do coração **29**

3.15 Análise histomorfométrica: avaliação de Colágeno fibrilar, Sindecan-4, Glipican-1 e FGF2 ..... **30**

3.16 Analise estatística **32**

4 RESULTADOS 33

4.1 Peso corporal **34**

4.2 Índice de Lee **35**

4.3 Glicemia e Triglicerídeos **36**

4.4 Dosagem de Insulina **38**

4.5 Teste de tolerância à insulina (ITT) **39**

4.6 Morfometria cardíaca **40**

4.7 Função cardíaca **41**

4.8 Pressão Arterial e Frequência Cardíaca de repouso **43**

4.9 Sensibilidade barorreflexa **45**

4.10 Avaliações do controle autonômico da frequência cardíaca no domínio do tempo e da frequência **46**

4.11 Variabilidade da Pressão Arterial Sistólica **47**

4.12 Avaliação Imunohistoquímica para proteoglicanos de superfície e FGF2 ..... **48**

4.13 Avaliação do Colágeno Fibrilar **50**

5 DISCUSSÃO 51

5.1 Parâmetros metabólicos **53**

5.2 Avaliação da morfometria e função cardíaca (Cardiomiopatia Diabética) **54**

5.3 Avaliações da função autonômica **57**

6 CONCLUSÃO 62

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 64

Lista de abreviaturas e siglas

ADA	Associação Americana de Diabetes
AF	Alta Frequência
AGES	Advanced Glycation end Products
BF	Baixa Frequência
C	Grupo Controle
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclico
CD	Cardiomiopatia Diabética
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CNA	Comprimento Naso-Anal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CR	Grupo Controle Resveratrol
D	Grupo Diabetes
dL	Decilitro
DM	Diabetes Mellitus
DMT1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DR	Grupo Diabetes Resveratrol
DT	Tempo de Desaceleração da Onda E
E	Velocidade de Pico Precoce
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FC	Frequência Cardíaca
FC	Frequência Cardíaca
FFT	Transformada Rápida de Fourier
FGF	Fibroblast Growth Factor
FID	Federação Internacional de Diabetes
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GAGs	Glicosaminoglicanos
GMP	Guanosina Monofosfato
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HC	Hospital das Clínicas
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
IC	Insuficiência Cardíaca

IGF-1	Insulin Like Growth Factor 1
IMC	Índice de Massa Corporal
InCor	Instituto do Coração
Kg	Quilogramas
KITT	Constante de Queda da Glicose Sanguínea
M	Molar
mg	Miligramas
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mmHg	Milímetro de Mercúrio
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão Arterial
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PBS	Tampão Fosfato Salino
PE	Polietileno
PGC-1 alfa	Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma Coactivator 1 alpha
PGs	Proteoglicanos
pH	Potencial de Hidrogênio
PTP1B	Proteína Tirosina Fosfatase 1B
PWT	Espessura da Parede Posterior
rpm	Rotações por Minuto
RSV	Resveratrol
sICAM-1	Molécula de Adesão Intracelular Solúvel-1
Sir2	Silent Information Regulator 2
STZ	Estreptozotocina
TRIV	Tempo de Relaxamento Isovolumétrico
VE	Ventrículo Esquerdo
VFC	Variabilidade da Frequência Cardíaca
VIP	Variabilidade do Intervalo de Pulso
VPA	Variabilidade da pressão arterial

Lista de Tabelas

Tabela 1 Peso corporal **34**

Tabela 2 Índice de Lee **35**

Tabela 3 Glicemia e Triglicerídeos **36**

Tabela 4 Insulina **38**

Tabela 5 Teste de tolerância à insulina (ITT) **39**

Tabela 6 Parâmetros morfométricos do ventrículo esquerdo **40**

Tabela 7 Função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo **41**

Tabela 8 Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) **43**

Tabela 9 Sensibilidade dos Pressorreceptores **45**

Tabela 10 Variabilidade da frequência cardíaca **46**

Tabela 11 Variabilidade da pressão arterial; Desvio Padrão da Pressão Arterial Sistólica (DP PAS), Variância da Pressão Arterial Sistólica (VARR PAS) e Banda de baixa Frequência (low frequency) (LF PAS) **47**

Tabela 12 Imunohistoquímica **48**

Tabela 13 Colágeno fibrilar **50**

Lista de Figuras

Figura 1 Sequência Experimental **18**

Figura 2 Indução do diabetes por STZ e STZ+Nico **19**

Figura 3 Procedimento de gavagem **20**

Figura 4 Aparelhos utilizados para análises das concentrações plasmáticas de glicose e triglicerídeos **21**

Figura 5 Ilustração da canulação: à esquerda: posição anátomo-cirúrgica da canulação de artéria e veia femoral. No centro e à direita: o feixe vásculo nervoso, composto pela veia femoral esquerda, artéria femoral esquerda e nervo femoral esquerdo **24**

Figura 6 Sistema de registro de pressão arterial e conexão entre a cânula e o transdutor eletromagnético **26**

Figura 7 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca antes e após a administração de drogas vasoativas **27**

Figura 8 Peso corporal e curva de ganho de peso **35**

Figura 9 Índice de Lee **36**

Figura 10 Glicemia **37**

Figura 11 Triglicérides **37**

Figura 12 Insulina **38**

Figura 13 Teste de tolerância à insulina (ITT) **39**

Figura 14 Relação pico da onda E com pico da onda A (relação E/A) e tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) **42**

Figura 15 Desaceleração da onda E e índice de performance miocárdica (IPM) **42**

Figura 16 Pressão arterial sistólica (PAS), Pressão arterial diastólica (PAD), Pressão arterial média (PAM) e Frequência cardíaca (FC) **44**

Figura 17 Sensibilidade Barorreflexa **45**

Figura 18 IP **46**

Figura 19 DP e variância da PAS **47**

Figura 20 LF absoluto **48**

Figura 21 Imunohistoquímica **49**

Figura 22 Avaliação do colágeno fibrilar **50**

Resumo

Cruz, P. L. Ação do resveratrol sobre proteoglicanos de membrana presentes no músculo cardíaco em modelo animal de cardiomiopatia diabética [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: Ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (STZ) apresentam alterações nos proteoglicanos Sindecan-4 e Glipican-1 no tecido cardíaco concomitantes à instalação da disfunção diastólica, evento precoce que culmina na cardiomiopatia diabética. O uso de resveratrol (RSV) em modelos animais foi capaz de melhorar a função cardíaca e o controle autonômico. Espera-se que o tratamento com esse flavonoide atue nos níveis alterados dos proteoglicanos em animais diabéticos. **Objetivo**: Avaliar o efeito do RSV nos parâmetros cardiovasculares e na expressão dos proteoglicanos no músculo cardíaco. **Materiais e Métodos**: Foram avaliados ratos Wistar machos, com doze semanas de vida, divididos em 4 grupos: controle (C, N=8); controle + RSV (CR, N=8); diabetes STZ + nicotinamida (D, N=8) e diabetes STZ + nicotinamida + RSV (DR, N=8). Foram dosados os níveis séricos de glicose, de triglicérides e foi feito o teste de resistência à insulina. Registros diretos das curvas de pressão arterial foram realizados para a análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e variabilidade da pressão arterial sistólica (VPAS) no domínio do tempo e da frequência. A sensibilidade barorreflexa foi avaliada por meio de drogas vasoativas e a função cardíaca foi avaliada por ecocardiografia de alta resolução. A localização das proteínas no tecido cardíaco foi feita por imunohistoquímica. Análise estatística utilizada: ANOVA *post test* Student Newman-Keuls. $p<0,05$. **Resultados:** O peso corporal dos grupos C e CR aumentou significativamente do inicio ao final do protocolo, enquanto os grupos D e DR mantiveram seu peso inicial. A concentração de glicose sérica e dos triglicerídeos, os grupos C e CR não demonstraram diferença ao longo do protocolo, enquanto os grupos D e DR demonstraram significante aumento ao final do protocolo. Os valores de concentração de insulina, do teste de tolerância à insulina e do índice de Lee foram menores nos grupos D e DR quando comparados aos grupos C e CR. A pressão arterial sistólica foi menor nos grupos diabéticos quando comparado aos grupos controles (C e CR) o mesmo acontecendo para os valores da frequência cardíaca. A pressão arterial diastólica apresentou valores semelhantes entre os grupos C e CR e o grupo DR, somente o grupo D apresentou queda quando comparado aos outros três grupos, a pressão arterial media apresentou esse mesmo comportamento. Não foram observadas diferenças para a sensibilidade barorreflexa tanto para a resposta bradicárdica como para a resposta taquicárdica entre os grupos. Nas avaliações da VFC foi observado o aumento do Intervalo de Pulso (IP) nos grupos D e DR quando comparados aos grupos C e CR, mas foram semelhantes entre os grupos controles e diabéticos (C vs. CR e D vs. DR, respectivamente). Na VPAS os grupos D e DR apresentaram diminuição tanto no desvio padrão (DP PAS) quanto na variância (VAR PAS) quando comparados aos grupos C e CR, não houve diferença entre os grupos controles e diabéticos (C vs. CR e D vs. DR, respectivamente). A disfunção

diastólica foi detectada no grupo D. A expressão das proteínas Glypican-1 e Syndecan-4, foram significantemente maiores no grupo D quando comparada aos demais grupos e menos expressas no grupo DR quando comparada aos demais grupos. **Conclusões:** A administração de RSV reverteu tanto alterações morfológias como a função cardíaca global que voltou a apresentar valores muito próximos aos valores de normalidade, sem alterar as condições hemodinâmicas e autonômicas.

Descritores: Diabetes; Resveratrol; Cardiomiopatia diabética; Controle autonômico; Proteoglicanos; Doenças cardiovasculares.

Summary

The role of Resveratrol on membrane proteoglycans present in heart muscle in a model of diabetic cardiomyopathy [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Introduction: Streptozotocin-induced rats model show changes in proteoglycans sindecan-4 and glipican-1 in cardiac tissue concomitantly with installation of diastolic dysfunction, which is an early event that culminates in diabetic cardiomyopathy. The use of resveratrol (RSV) in animal models showed the improvement of cardiac function and autonomic control. It is expected that the treatment with this flavonoid act on altered levels of proteoglycans in diabetic rats. **Objective:** To evaluate the effects of resveratrol in cardiovascular parameters and the expression of proteoglycans in cardiac muscle. **Material and Methods**: Male Wistar rats (12 weeks old) were allocated into 4 groups: control (C, N=8), controle+RSV (CR, N=8), Diabetes STZ + nicotinamide (D, N=8) and diabetes STZ+ nicotinamide + RSV (DR, N=8). Serum levels of glucose, insulin resistance test and triglycerides were measured in order to evaluate diabetes. Arterial blood pressure records were measured in order to analyze the heart rate variability (HRV) and systolic blood pressure variabilities in frequency and time domain. The baroreflex sensivity was evaluated by vasoactive drugs infusion and the evaluation of cardiac function by high resolution echocardiography. The location of the proteins in the heart tissue was performed by immunohistochemistry. Statistics and performed analysis used: ANOVA *post test* Student Newman-Keuls. $p<0,05$. **Results:** Our results showed that the body weight of groups C and CR increased significantly from the beginning to the end of the protocol, while the groups D and DR continued to have the initial weight. Regarding serum glucose concentration and triglycerides, there were no statistically significant differences between group C and CR while the group D and DR increased significantly at the end of the protocol. The values of insulin concentration, insulin tolerance test and the Lee index were lower in groups D and DR when compared to groups C and CR. The hemodynamic parameters demonstrated that systolic blood pressure was lower in diabetic groups when compared to control groups (C and CR) as well as the heart rate values. Interestingly, diastolic blood pressure showed similar values between groups C, CR and group DR. The group D decreased its diastolic blood pressure when compared to the other groups, as well as the blood pressure mean. There were no significant differences either to baroreflex sensivity, bradicardiac response and tachycardia between both groups. The evaluation of heart rate variability (HRV) showed an increase of pulse interval (PI) in groups D and DR when compared to groups C and CR. The evaluation of systolic blood pressure variability of the groups D an DR showed a decrease in both the standard deviation (SD PAS) and variance when compared to groups C and CR and there were no differences between the diabete groups and the control (C vs CR and D vs DR respectively). The diastolic disfunction was detected in group D. The Glypican-1 and Syndecan-4 protein

expression were significantly higher in group D when compared to the other groups and less expressed in group DR when compared to the other groups. **Conclusion:** The administration of RSV reversed both morphological changes and the global cardiac function, which showed very close values to the normal range values, without changing the hemodynamic and autonomic conditions.

Keywords: Diabetes; Resveratrol; Diabetic Cardiomyopathy; Autonomic Control; Proteoglycans; Cardiovascular diseases.

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Fisiopatologia do Diabetes

O diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica de múltiplas etiologias, caracterizado principalmente por hiperglicemia crônica decorrente da má absorção de glicose plasmática, defeitos na secreção ou falta de insulina. Desta forma as células são impedidas de desempenhar corretamente suas funções vitais (MARTIN-TIMON *et al.*, 2014).

Segundo os critérios da Associação Americana de Diabetes (ADA) os dois principais tipos de diabetes são o diabetes do tipo 1 (DMT1) e o diabetes do tipo 2 (DMT2) (ADA, 2014; SBD, 2015). O DMT1, na maioria dos casos, é uma doença autoimune, mediada por células como linfócito T e macrófagos (MARTIN-TIMON *et al.*, 2014). Caracteriza-se pela destruição das células beta do pâncreas responsáveis pela produção de insulina e, como consequência, desenvolve-se uma deficiência do organismo em metabolizar a glicose, devido à baixa ou a não produção de insulina. Nestas condições, a glicose que deveria se deslocar para o compartimento intracelular, atinge valores elevados no sangue e, em excesso, agrega-se a proteínas num processo chamado glicação. Como consequência são formados os produtos finais de glicação avançada (AGES, do inglês *advanced glycation end products*), caracterizados por um complexo de açúcar e proteína, rígido. Nessa nova configuração a estrutura dessas proteínas se altera comprometendo o desempenho eficiente de seus papéis no organismo. A glicação está na base de patologias vasculares tão frequentes em pacientes diabéticos levando a diminuição da qualidade de vida e da longevidade (BARBOSA *et al.*, 2008). Na maioria dos casos o DMT1 aparece na infância ou adolescência, podendo

surgir também em outras faixas etárias; no entanto, o processo de autodestruição das células beta pancreáticas se inicia meses antes do diagnóstico clínico da doença de modo que cerca de 70% a 90% das células beta foram destruídas após os primeiros sintomas de hiperglicemia (RAZACK & WHERRETT, 2005).

O DMT2 é desencadeado, na maioria das vezes, pela obesidade associada a pré-disposição genética. Os casos estão ligados ao estilo de vida, como alimentação inadequada, sobrepeso, sedentarismo, etilismo, tabagismo e ao histórico familiar. O principal fenômeno fisiopatológico é a resistência celular à ação da insulina, o que diminui a captação de glicose nos tecidos, embora possa haver também insuficiência de insulina. No início da doença, os valores de glicemia podem estar dentro de faixas de normalidade, porém já ocorre hiperinsulinemia compensatória, situação esta que pode durar meses ou anos (OLOKOBA *et al.*, 2012).

O DMT2 é o tipo mais comum e corresponde a 90% dos casos, sendo que cerca de 50% dos portadores desconhecem sua condição, justamente pela pequena intensidade de sintomas que manifestam inicialmente. As complicações podem demorar de três a cinco anos para serem notadas (LIN & SUN, 2010; OLOKOBA *et al.*, 2012).

Quando não controlada, a doença promove uma série de alterações entre elas as vasculares e as autonômicas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o diabetes está associado a complicações agudas, como a cetoacidose diabética, em situações de extrema deficiência da ação insulínica, e a complicações tardias, que acometem olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos, que são frequentemente incapacitantes para a vida ou causam invalidez. As complicações crônicas do diabetes podem ser divididas em: doenças microvasculares e doenças macrovasculares (ADA, 2014; SBD, 2015). As complicações microvasculares são aquelas que causam danos aos pequenos vasos sanguíneos como a retinopatia, nefropatia e neuropatia diabética. As

complicações macrovasculares incluem a aterosclerose, doença arterial periférica, doença carotídea e doença arterial coronariana (VAN DE WEIJER *et al.*, 2011). Como consequência, pessoas diabéticas são mais propensas a sofrer infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (MARTIN-TIMON *et al.*, 2014).

1.2 – Epidemiologia

O diabetes é uma doença silenciosa e afeta cerca de 382 milhões de pessoas em todo o mundo, de acordo com dados da Federação Internacional de Diabetes (FID). A estimativa é de que, até 2035 esse número aumente para 592 milhões, caso não forem tomadas providências para modificar a trajetória da doença.

Hoje, o diabetes afeta 8,3% da população adulta mundial. O Brasil encontra-se em quinto lugar, cerca de 12 milhões de casos. Estimativas apontam que, até 2035, serão 38,5 milhões de diabéticos na América Latina (atualmente são 24,1 milhões), o que significa 9% da população adulta, sendo que em 46% dos casos os pacientes desconhecem serem portadores da doença (FID, 2013).

1.3 – Cardiomiopatia Diabética

O impacto da doença é grave e os pacientes têm um aumento do risco de desenvolver insuficiência cardíaca (IC) na ausência de hipertensão e doença coronariana, no que se convencionou chamar de cardiomiopatia diabética (CD). A CD caracteriza-se por hipertrofia, necrose, apoptose e aumento do tecido intersticial miocárdico (BOUDINA & ABEL, 2007). Acredita-se que a CD seja decorrente de anormalidades metabólicas como hiperlipidemia, hiperinsulemia e hiperglicemia, e de

alterações do metabolismo cardíaco. Tais alterações relacionadas com a diminuição da contratilidade miocárdica podem causar aumento do estresse oxidativo, fibrose intersticial, perda celular, comprometimento do trânsito intracelular de íons, produção aumentada do sistema renina-angiotensina e piora na homeostase do cálcio. No momento em que surgem os sinais e sintomas de insuficiência cardíaca, observa-se disfunção diastólica (presente em 37% dos pacientes diabéticos), que pode evoluir para uma disfunção sistólica, sendo que o comprometimento da função sistólica, habitualmente, é tardio e associado a um pior prognóstico (BOUDINA & ABEL, 2007; KHAVANDI *et al.*, 2009).

Muitos mecanismos foram propostos para explicar o desenvolvimento da cardiomiopatia diabética, mas provavelmente são as permutações genômicas manifestadas por alterações celulares, estruturais e funcionais, promovidas pelo meio hiperglicêmico e hiperlipidêmico em que está inserido o coração diabético é que culminam no desenvolvimento desta cardiomiopatia (KHAVANDI *et al.*, 2009). Grande número de estudos experimentais tem associado a disfunção diastólica ao aumento do volume de colágeno no tecido cardíaco (JALIL *et al.*, 1989). Vários estudos tentam identificar os mecanismos envolvidos na instalação desta cardiomiopatia na tentativa de favorecer intervenções que resultem no impedimento ou redução de sua progressão (OKOSHI *et al.*, 2007).

1.4 – Controle Autonômico

O controle autonômico também se altera com o diabetes. Sabe-se que a regulação neural cardíaca pela integração da atividade do sistema nervoso simpático e parassimpático é responsável pela manutenção da função cardíaca normal. E para que

haja o controle da homeostase cardiovascular é necessária a atuação dos reflexos originados pelos pressorreceptores arteriais (barorreflexo), cardiopulmonares e por sua integração central (MANCIA *et al.*, 1994).

A avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores (barorreflexo) e a análise das variabilidades da frequência cardíaca e da pressão arterial são excelentes medidas de função autonômica (IRIGOYEN *et al*., 2004).

Os pressorreceptores arteriais são mecanorreceptores sensíveis às deformações da parede vascular responsáveis pelo controle da pressão arterial (PA) em curto prazo, ou seja, momento a momento (IRIGOYEN *et al*., 2003). Além do controle reflexo da atividade autonômica, os pressorreceptores também exercem controle tônico sobre a atividade simpática (inibição) e parassimpática (estimulação). Quando sua função está comprometida, podem ocorrer alterações primárias de outros mecanismos de controle da função cardiovascular, por falta de modulação adequada da atividade simpática e parassimpática (IRIGOYEN *et al.*, 1995).

Outra forma de avaliar o controle autonômico sobre o aparelho cardiovascular é o estudo da variabilidade da frequência cardíaca (FC) (JOAQUIM *et al*., 2005). Os estudos mostram que irregularidades nas variabilidades da PA e da FC significam algum tipo de anormalidade, e que a diminuição da variabilidade da FC é um marcador de mau prognóstico (RIBEIRO & MORAES, 2005).

1.5. – Modelos experimentais de diabetes

A estreptozotocina (STZ) é um agente quimioterápico, utilizado no tratamento de tumores carcinoides e endócrinos do pâncreas. Atua por meio da diminuição da ação da adenina-nicotinamida das células beta-pancreaticas, inibindo a síntese de DNA,

consequentemente bloqueando de forma irreversível a produção de insulina, causando grave hiperglicemia, induzindo o DM em animais, semelhante ao DM tipo 1 em humanos (MASIELLO *et al*., 1998).

Ratos diabéticos induzidos por STZ e não tratados com insulina, apresentam as mesmas alterações observadas em humanos como: hiperglicemia, polidipsia, poliúria, perda de peso, polifagia, cardiomiopatia e neuropatia diabética (JUNOD *et al.*, 1969). O comprometimento do sistema nervoso autônomo pode levar a várias alterações funcionais particularmente observáveis no sistema cardiovascular (DE ANGELIS *et al*., 2002). Os animais nestas condições apresentam bradicardia após a administração de STZ, queda da PA, redução da variabilidade da FC, alterações na frequência cardíaca intrínseca, no tônus vagal e no controle reflexo cardiovascular (barorreflexo e quimiorreflexo) (DE ANGELIS *et al*., 2002; FARAH *et al*., 2007). Essas alterações podem estar ainda relacionadas às mudanças desfavoráveis na estrutura tecidual cardíaca e na função ventricular observada em ratos diabéticos (DE ANGELIS *et al*., 2000).

A STZ pode ser associada à administração prévia de nicotinamida. Assim, os animais apresentam-se menos debilitados mantendo, porém, todas as características do diabetes encontradas no modelo tradicional. A nicotinamida é uma vitamina do complexo B hidrossolúvel cujos derivados (NAD+, NAH, NADP+ e NADPH) desempenham importante papel no metabolismo energético celular e na reparação do DNA. Outras funções da nicotinamida incluem a remoção de substâncias tóxicas do organismo e auxiliar a produção de hormônios esteróides pelas glândulas supra-renais (SZKUDELSKI, 2012).

1.6 – Glicosaminoglicanos e Proteoglicanos

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são polímeros lineares longos, não flexíveis, não ramificados, e têm como base unidades dissacarídicas repetidas, sendo que um dos açúcares sempre é um açúcar aminado (N-acetilglicosamina ou Nacetilgalactosamina), e o segundo açúcar é normalmente um ácido urônico (glicurônico ou idurônico). São classificados em cinco tipos: ácido hialurônico, condroitim, dermatan, heparam e queratam, de acordo com o tipo de açúcar, com o tipo de ligação glicosídica, número e localização dos grupos sulfatos.

Todos os glicosaminoglicanos (com exceção do ácido hialurônico) fazem ligações covalentes com proteínas, formando uma grande diversidade de proteoglicanos que podem ser localizados na matriz extracelular intersticial, nas lâminas basais em regiões pericelulares, inseridos na membrana plasmática ou mesmo em situação intracitoplasmática (COUCHMAN & PATAKI, 2012).

A porção proteica dos proteoglicanos é sintetizada pelos ribossomas no retículo endoplasmático granular. A ligação com cadeias de GAGs é efetuada no Golgi em etapas que envolvem a atividade de várias enzimas. Após a síntese, o PG é transportado em vesículas secretoras e endereçado para membrana celular ou matriz extracelular (PRYDZ & DALEN, 2000).

Os proteoglicanos exercem várias funções, sendo que a mais conhecida é sua capacidade de fornecer resiliência aos tecidos, acomodando forças compressivas e preenchendo espaços; devido à sua carga iônica negativa tem capacidade de adsorver as moléculas de água da matriz extracelular; assim sendo, os proteoglicanos são os principais responsáveis pela manutenção do turgor tecidual regulando a permeabilidade do tecido conjuntivo (PERRIMON & BERNFIELD, 2001; OZZO, 1998). A

importância funcional dos proteoglicanos vai além desse papel estrutural, uma vez que, tanto a porção proteica como os GAGs, interagem com numerosos fatores de crescimento, citocinas, receptores de membrana de diversas células e outros elementos da matriz extracelular, regulando processos de sinalização celular, proliferação, migração, diferenciação, apoptose e adesão (WU *et al.*, 2005). No entanto, o foco desse trabalho está em duas famílias de proteoglicanos associados à membrana celular: sindecan e glipican.

Sindecan e glipican são proteoglicanos que participam do glicocálix (estrato de açúcares que recobre a superfície celular), ancorando-se diretamente à membrana plasmática. Os sindecans são moléculas transmembrana que se ligam, por um lado, ao citoesqueleto e, pelo outro, aos elementos da matriz extracelular. Já os glipicans estão ancorados à membrana por sua ligação com o glicosilfosfatidilinositol (GPI). Tanto no sindecan como no glipican, as moléculas de GAG são heparan-sulfato; assim, são conhecidos como "proteo-heparans de membrana" (HSPG), diferenciando-os do perlecan, que é o proteo-heparan da matriz extracelular, presente nas lâminas basais.

Em estudo realizado em ratos diabéticos induzidos por STZ, observou-se um aumento na concentração de sindecan-4 e glipican-1, em tecido cardíaco. Esta alteração foi acompanhada por disfunção diastólica, evento inicial da cardiomiopatia diabética, caracterizada por alterações no pico da velocidade no início da diástole e tempo de relaxamento isovolumétrico, observados através do ecocardiograma (STRUNZ *et al.*, 2011).

1.7 – Fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF2)

Os dados da literatura sugerem que o FGF2 é um mediador importante da hipertrofia cardíaca (PELLIEUX *et al.*, 2001). Os proteoglicanos de membrana celular tem capacidade de reter o FGF2 adsorvido nas proximidades da superfície celular, através de interação de baixa afinidade.

No entanto, após estímulo adequado, o FGF2 ativa receptores celulares de alta afinidade, provavelmente o FGFR1, que predominam nos cardiomiócitos.

Sabe-se que a ligação FGF2 com o receptor FGFR1 é capaz de promover o remodelamento celular, estimulando a proliferação celular e ativando fatores de transcrição que regulam genes relacionados à hipertrofia miocárdica (KARDAMI *et al*., 2004; ITOH & OHTA, 2013).

1.8 – Resveratrol

A sociedade moderna busca, cada vez mais, o consumo de alimentos que possam tratar e prevenir doenças, bem como aumentar a longevidade. Diversos produtos podem afetar processos biológicos relacionados à DCV; dentre eles, destacam-se os chamados "alimentos funcionais" que são definidos como produtos que contem alguma substância biologicamente ativa cuja ingestão pode levar à redução do risco de doenças. Destacam-se aqui os alimentos ricos em compostos oxidantes com ação benéfica à saúde já comprovada como é o caso do resveratrol (SAUTTER *et al*., 2005).

O resveratrol (RSV, 3,5,4'-trihydroxystilbene) é um polifenol presente em uvas de casca escura e, consequentemente, em vinhos tintos. Popularizou-se pela observação

da baixa morbidade cardiovascular da população mediterrânea associada ao hábito de beber vinho tinto de forma moderada, criando-se assim o “paradoxo francês”.

O RSV age como inibidor da agregação plaquetária e coagulação e também apresenta ação anti-inflamatória, regula o metabolismo lipoproteico e age como quimiopreventivo (DEPAK & MAULIK, 2006; SAUTTER *et al*., 2005).

As pesquisas mostram que o resveratrol é capaz de inibir a agregação plaquetária em pacientes resistentes à aspirina, o que poderia eventualmente contribuir para o seu papel cardioprotetor.

O efeito protetor do resveratrol sobre células endoteliais na redução da atividade trombogênica, com a consequente diminuição da agregação plaquetária, foi demostrado por diversos estudos (BERTELLI *et al*., 1995; STEF *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2002; LAGOUGE *et al.*, 2006; CHEN *et al*., 2007).

Além disso, o RSV exerce ação antioxidante por meio do aumento da síntese de óxido nítrico, da inibição da peroxidação lipídica, da retirada de radicais hidroxil e peroxil da circulação e por sua similaridade química com o estrogênio (DEPAK & MAULIK, 2006; LABINSKYY *et al.*, 2006).

Especificamente no sistema cardiovascular, há evidências que o resveratrol confere proteção contra lesões de reperfusão do miocárdio isquêmico, diminui a formação de placas ateroscleróticas e atenua a arritmia ventricular além de inibir a apoptose dos cardiomócitos (DAS & MAULIK, 2006; DAS & DAS, 2007).

Estudos mostram que o consumo de polifenóis limita o desenvolvimento de lesões ateromatosas por inibir a oxidação do LDL, que é considerado mecanismo chave em lesões endoteliais que ocorrem na aterosclerose (D’ARCHIVIO *et al*., 2007).

O RSV apresenta efeito anti-inflamatório, associado à diminuição da quantidade de citocinas em células vasculares e de moléculas de adesão, tais como sICAM-1

molécula de adesão intracelular solúvel-1, sE-Selectina, molécula de adesão leucócito endotélio-1, molécula de adesão da célula vascular-1 (PENDURTHI *et al.*, 1999; OAK *et al*., 2005; LABINSKYY *et al.*, 2006).

Em modelos animais de obesidade e diabetes tipo 2, o RSV atenuou a resistência à insulina através da translocação do GLUT 4 e aumentou o tempo de vida dos animais diabéticos (LAGOUGE *et al*., 2006).

Experimentos realizados em camundongos mostraram que o tratamento com RSV elevou a capacidade aeróbica constatada por meio do aumento do tempo de corrida e do consumo de oxigênio nas fibras musculares. Seu efeito está associado à indução da expressão de genes da fosforilação oxidativa e biogênese mitocondrial. Mais ainda, o RSV protegeu os camundongos da obesidade e da resistência à insulina induzidas experimentalmente pela dieta (PICARD *et al*., 2004; BAUR *et al*., 2006; LAGOUGE *et al.*, 2006).

Baur e col. (2006) mostraram que a administração de RVS reverteu as alterações metabólicas de camundongos consumidores de dieta altamente calórica para um padrão parecido com o de camundongos consumidores de dieta normal. Esta modulação envolveu processos como aumento da sensibilidade à insulina, redução do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), aumento da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato cíclico (cAMP), da atividade da PGC1-alfa, do número de mitocôndrias e melhora da função motora.

Estudos experimentais em ratos com diabetes por indução por STZ mostraram ações hipoglicemicas e hipolipemiantes do RSV (VESSAL *et al.*, 2003; SU *et al*., 2006). Além disso, o RSV também promoveu a melhora da função cardíaca nestes animais (SULAIMAN *et al.*, 2010; YAR *et al.*, 2011).

Qin e col. (2012) associaram a síndrome metabólica provocada em camundongos submetidos a uma dieta rica em açúcar e gordura ao desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda precedida de disfunção diastólica. No entanto, no grupo de animais que recebeu RSV, não foram observadas disfunção diastólica e hipertrofia ventricular esquerda. Este efeito pode ser atribuído a diversos mecanismos, dentre eles, a redução do estresse oxidativo e à melhora da resistência à insulina (QIN *et al.*, 2012).

HIPÓTESE E OBJETIVOS

2 – HIPÓTESE E OBJETIVOS

Considerando-se que: 1) as evidências que mostram os efeitos benéficos da adminstração de RSV sobre afecções cardiovasculares de diferentes etiologias, e 2) ratos induzidos ao diabetes mellitus por STZ apresentam disfunção hemodinâmica associadas à hipertrofia cardíaca, fibrose miocárdica e modificação dos proteoglicanos de membrana, estabeleceu-se a hipótese de que a administração de RSV poderia ter um efeito protetor para o miocárdio de animais diabéticos.

Os objetivos desse estudo foram avaliar o efeito do resveratrol em modelo experimental de DM induzido por estreptozotocina sobre os seguintes parâmetros:

– Alterações metabólicas (peso corporal, glicemia, triglicérides, insulina e resistência à insulina);

– Hemodinâmicas e autonômicas (pressão arterial, frequência cardíaca, sensibilidade dos pressorreceptores, controle autonômico, variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial);

– Morfofuncionais cardíacas (função diastólica e sistólica);

– Na quantidade de proteoglicanos de membrana (sindecan 4 e glipican 1) nos cardiomiócitos.

– Na expressão de FGF2.

– Na quantidade de colágeno fibrilar no miocárdio.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi realizado em conformidade com os procedimentos ARRIVE para experimento animal (KILKENNY *et al.*, 2010) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) conforme o parecer 338/12.

3.1 – Animais

Foram utilizados ratos (Rattus norvegicus) variedade Wistar machos, de doze semanas, pesando entre 300g e 350g, provenientes do centro de bioterismo da FMUSP, alocados no Biotério da Divisão de Experimentação do Instituto do Coração (InCor / HC FMUSP), em ambiente com temperatura controlada (22°C – 24°C) e ciclo de 12 horas claro/escuro).

Água potável e comida oferecida de modo irrestrito, com dieta industrial normoproteica (12% de proteínas). A acomodação foi de até quatro animais por caixa no período de oito semanas e após os procedimentos cirúrgicos os mesmos foram mantidos em caixas individuais, totalizando nove semanas de estudo. Os animais eram pesados semanalmente.

Os animais foram divididos em quatro grupos:

Grupo **Controle** (C) – composto por oito animais normais;

Grupo **Controle + Resveratrol** (CR) **–** composto por oito animais normais submetidos à administração de resveratrol;

GRUPO **Diabetes** (D) **–** composto por oito animais com indução de diabetes por STZ + Nicotinamida;

GRUPO **Diabetes + Resveratrol** (DR) – composto por oito animais com indução de diabetes por STZ + Nicotinamida e submetidos à administração de resveratrol.

3.2 – Sequência Experimental

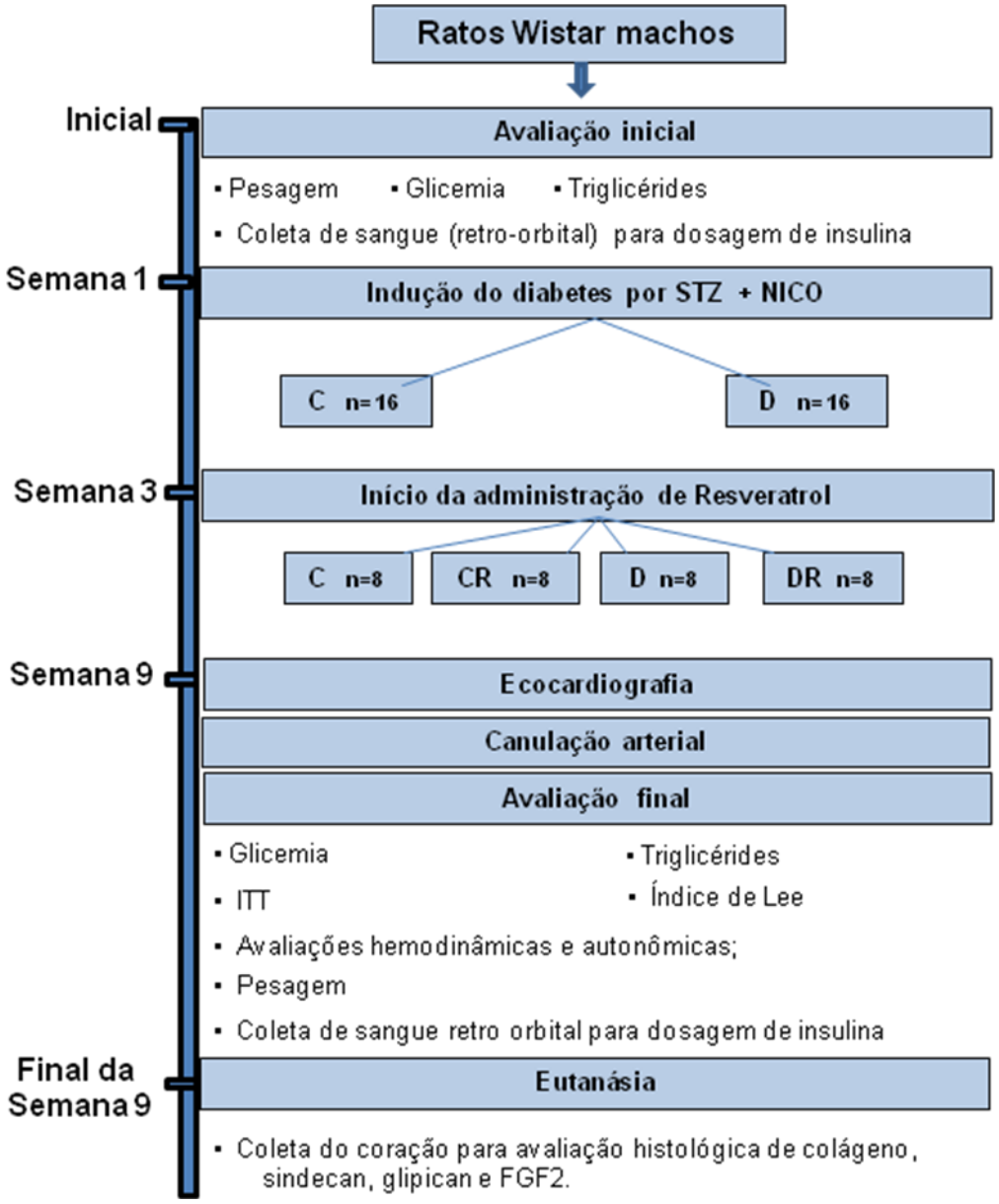

Figura 1. Sequência Experimental

3.3 – Indução ao diabetes experimental

Para a indução do diabetes os animais foram mantidos em jejum por 6 horas previamente à injeção intraperitonial (i.p.) de 100mg/kg de nicotinamida diluída em solução de cloreto de sódio 0,9%. Após 15 minutos, os animais foram anestesiados com gás isoflurano na concentração de 1ml/ml a 2,5% (Cristalia, São Paulo) e, pela veia caudal, receberam uma injeção de 50mg/Kg de STZ dissolvida em tampão citrato 0,01 M, pH 4,5 (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA). Os animais dos grupos controles receberam injeção i.p. de solução de cloreto de sódio 0,9%, substituindo a nicotinamida e injeção do tampão citrato substituindo a STZ. (Figura 2).

Figura 2. llustração mostrando o procedimento de injeção caudal da solução de estreptozotocina para indução do diabetes do rato.

Após 15 dias de indução, foram considerados diabéticos os ratos com glicemia de jejum igual ou superior a 180mg/dL.

3.4 – Administração do resveratrol

O RSV foi diluído em etanol (recomendação do fabricante) na concentração semelhante ao vinho (12%). A administração de 22,04mg de solução de RSV por quilo foi feita, diariamente, a partir do ínicio da 3ª semana (15º dia) e ao longo de seis semanas, através do procedimento de gavagem (Figura 3). Os animais controles (grupos C e D) receberam apenas 12% de etanol diluído em água ultrapura (Milli-Q®).

A dose de RSV administrada não apresenta toxicidade em animais (COTTART *et al.*, 2010).

Figura 3 – Fotografia ilustrativa da administração da solução de Resveratrol por gavagem.

3.5 – Monitoramento dos níveis de glicose e triglicérides

A avaliação da glicose e dos triglicerídeos foi realizada em gotas de sangue da cauda utilizando-se dispositivos portáteis (Accu-Chek e Accutrend GTC (Roche, IN, EUA), respectivamente mostrados na Figura 4. Para cada coleta, os animais foram submetidos a 4 horas de jejum (DE ANGELIS *et al.*, 2000; DE ANGELIS LOBO D'AVILA *et al.*, 1999; MAEDA *et al.*, 1995; SOUZA *et al.*, 2007). As medidas foram

realizadas antes da indução do diabetes e posteriormente, no 3°, 7° e 14° dia. Após o 14° dia as avaliações ocorreram semanalmente até o final do protocolo.

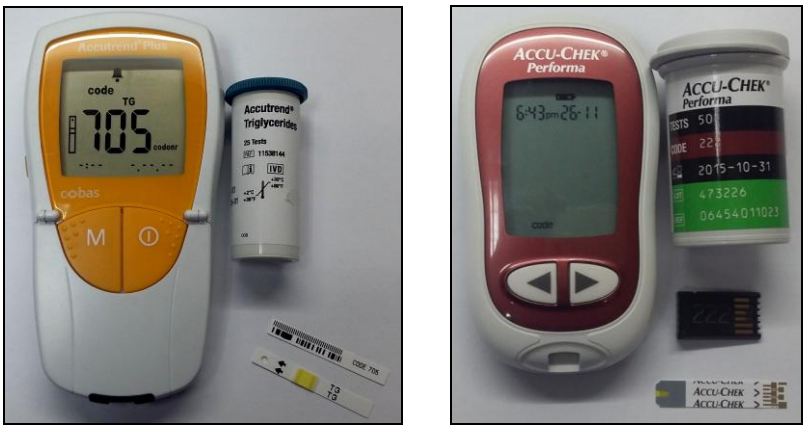

Figura 4. Ilustração dos aparelhos portáteis utilizados para análises das concentrações plasmáticas de triglicerídeos e glicose.

3.6 – Coleta de sangue retro-orbital para dosagem de insulina

Os animais foram submetidos à coleta de sangue através do sinus retro orbital (NEVES *et. al.*, 2013), no início e no final do protocolo.

Os animais foram anestesiados com gás isoflurano na concentração de 1ml/ml a 2,5% (Cristalia, São Paulo) e um tubo capilar foi introduzido lentamente sob o globo ocular. Durante a entrada movimentos giratórios foram feitos até que o sangue fluísse pelo tubo. Foi coletado um total de 2ml de sangue por animal em tubo seco. O soro foi obtido por centrifugação do sangue total por 15 minutos a 3000 rpm, 4°C, e armazenado a -80°C para posteriores análises.

A insulina foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando-se *kit* comercial para análise de insulina em ratos da marca Mercodia (Uppsala, Suécia). O método baseia-se na técnica direta de sanduiche no qual, durante a incubação a insulina

da amostra reage com o anticorpo anti-insulina, conjugado com peroxidase e com um anticorpo anti-insulina, presente na placa.

Pela lavagem das placas com solução salina fosfatada (PBS-Tween 0,1%), o anticorpo que não se ligou à insulina é eliminado, enquanto, o anticorpo conjugado com a peroxidase, ligado a insulina, é detectado pela reação 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. A reação é interrompida com a adição de um ácido (H_2SO_4), produzindo um composto róseo avermelhado detectado, por absorbância, em um leitor de placas a 450nm (Asys Hitech).

As concentrações de insulina foram calculadas a partir de curvas padrão e os resultados expressos em mg/dL.

3.7 – Ecocardiografia

A ecocardiografia de alta resolução foi realizada após o término da administração do resveratrol. Três ciclos cardíacos representativos foram analisados e a média foi calculada para cada medição. Todas as medidas foram obtidas de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (BILATE *et al.*, 2003).

Utilizou-se o aparelho Sequoia 512 (Acuson, Mountain View, CA) equipado com um transdutor linear 13-MHz (SALEMI *et al.*, 2005). Os animais foram anestesiados (i.p.) com 50mg/Kg de cloridrato de quetamina (Ketalar, Parke-Davis) e 12mg/Kg de cloridrato de xilazina (Rompum, Bayer).

O diâmetro sistólico (LVSIS) e diastólico final do ventricular esquerdo (LVDIA), e a espessura da parede posterior (PWT), ambos em diástole, foram medidos ao nível dos músculos papilares no eixo curto, usando uma imagem 2-D M-mode guiada (PIRES *et al.*, 2003).

A fração de encurtamento foi calculada a partir de imagens em modo-M (BILATE *et al.*, 2003).

A massa do ventrículo esquerdo (VE) foi calculada a partir de imagens em modo-M, usando a fórmula do cubo não corrigida, assumindo uma geometria esférica do ventrículo esquerdo (SALEMI *et al.*, 2005). O índice de massa VE, foi determinado, como a razão da massa do VE em gramas pelo peso corporal em gramas.

A velocidade de pico precoce (E) e tardio de enchimento (A), a relação E / A, o tempo de desaceleração da onda E (DT), e o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) foram obtidos a partir das gravações do fluxo mitral (SALEMI *et al.*, 2005). DT e TRIV foram obtidos quando as ondas E e A não estavam fundidas.

3.8 – Índice de massa corpórea (Índice de Lee)

Durante a anestesia para o ecocardiograma os animais foram pesados e o comprimento naso-anal (CNA) foi medido. A partir destes dados, calculou-se o um índice de massa corpórea (Índice de Lee) de cada animal. O resultado que é obtido pela razão da raiz cúbica do peso corporal (em gramas) sobre o CNA (em centímetros), $\frac{3\sqrt{\text{Peso}}(\text{g})}{\text{CNA}(\text{cm})} . 10$ (NOVELLI *et al.*, 2007).

3.9 – Cirurgia de canulação

Para os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com gás isoflurano na concentração de 1ml/ml a 2,5% (Cristália, Br), e colocados em decúbito dorsal para a realização de uma pequena incisão na região inguinal por onde foram

implantados cateteres, confeccionados com tubos de Micro-Renathane (MRE-025 com diâmetro externo de 0,61mm e diâmetro interno de 0,28mm, Braintree Scientific) e Policloreto de Vinila (Abbott), equivalente ao polietileno PE50, esticados em ar quente, preenchidos com soro fisiológico e ocluídos com pinos de aço inoxidável. Os cateteres foram posicionados no interior da artéria e veia femorais para registro da PA, FC e administração de drogas, respectivamente (Figura 5).

Após o implante, os catéteres foram exteriorizados no dorso do animal na região cervical e fixados com fio de algodão na pele (FLUES *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2007; IRIGOYEN *et al.*, 2005; DE ANGELIS LOBO D'AVILA *et al.*, 1999). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições assépticas, sob visão de um microscópio cirúrgico (DF Vasconcelos modelo MCM 5, São Paulo).

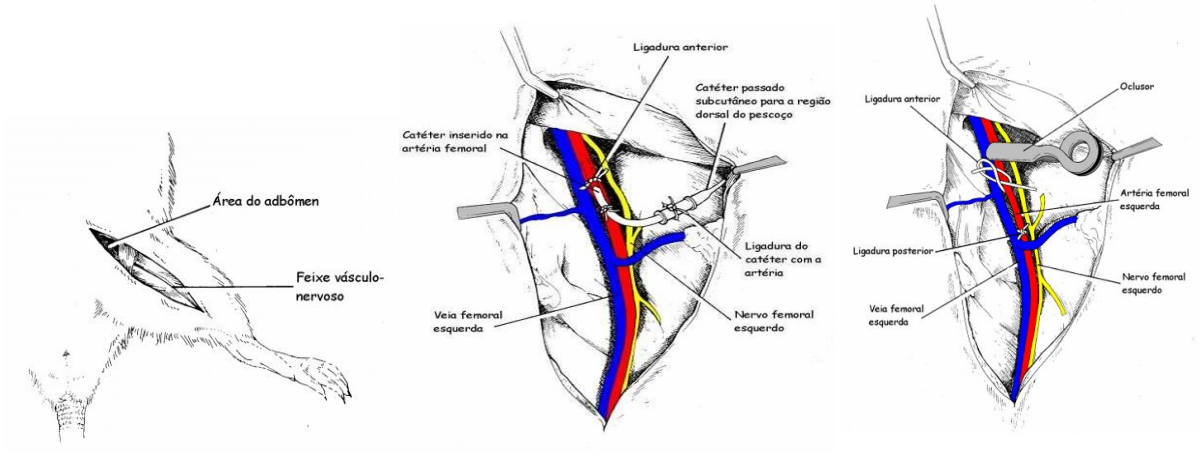

Figura 5. Ilustração da canulação: à esquerda: posição anátomo-cirúrgica da canulação; ao centro e à direita estão representadas etapas do procedimento de canulação.

Ao término da cirurgia, os animais receberam uma injeção intramuscular de 10^7U/Kg penicilina G (Benzetacil, Fontoura-Wyeth) e analgésico (0,35g/kg de Dipirona

Sódica). Os cuidados pós-operatórios foram baseados na descrição (LILES & FLECKNELL, 1992).

3.10 – Registros da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca de Repouso

Os registros foram realizados 24h após a canulação com os animais acordados. Para a realização das avaliações hemodinâmicas sistêmicas, a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal pela caixa, durante todo o período do experimento. Esta extensão foi conectada a um transdutor eletromagnético (Kent Instruments, EUA) que, por sua vez, estava conectado a um pré-amplificador (Stemtech, EUA) (Figura 6).

Sinais de pressão arterial foram gravados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (Windaq, DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 2000 Hz por canal, para estudo dos valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Os valores de frequência cardíaca foram derivados do sinal pulsátil da pressão arterial.

Figura 6. Sistema de registro de pressão arterial e conexão entre a cânula e o transdutor eletromagnético.

3.11 – Sensibilidade dos Pressorreceptores

Após o registro basal, uma extensão de aproximadamente 20 cm (PE10) foi conectada na cânula venosa para possibilitar a injeção de drogas vasoativas. A sensibilidade dos pressorreceptores foi testada através da infusão de doses crescentes de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company).

Para avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores, o pico máximo ou mínimo da PAM foi subtraído dos valores de PAM do período controle. Da mesma forma, a variação máxima da FC foi subtraída dos valores de FC do período controle, imediatamente antes da infusão das drogas, para posterior quantificação das respostas. A sensibilidade barorreflexa foi avaliada pelo índice calculado através divisão da variação da FC pela variação da PAM (DE ANGELIS, K. L. *et al*., 1997; DE ANGELIS LOBO D'AVILA *et al.*, 1999; IRIGOYEN *et al.*, 2005). As drogas foram injetadas randomicamente entre os animais, iniciando-se com um ou outro fármaco.

A fenilefrina, um potente estimulador α1 cuja ação predominante ocorre nas arteríolas periféricas causando vasoconstrição, foi usada para provocar aumento da

pressão arterial. Esse aumento da pressão arterial é seguido de bradicardia reflexa comandada pelos pressorreceptores. O nitroprussiato de sódio, um potente vasodilatador tanto de arteríolas como de veias, foi usado para provocar queda da pressão arterial. Sua ação ocorre por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3',5'-guanosina monofosfato (GMP cíclico) na musculatura lisa de vasos e outros tecidos. Essa queda é seguida por uma resposta taquicárdica reflexa comandada pelos pressorreceptores (Figura 7).

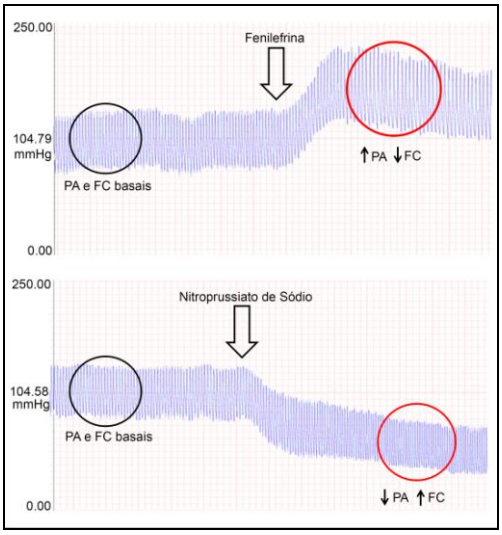

Figura 7. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca antes e após a administração de drogas vasoativas.

Para a fenilefrina foram utilizadas as doses 0,5, 1, 2, 4, 8 µg/ml e para o nitroprussiato de sódio foram 5, 10, 20, 40, 80 µg/ml. Quando a PA não apresentava uma diferença de 40mmHg entre o repouso e o efeito máximo da droga eram aplicadas doses de 16 µg/ml para fenilefrina e 100 µg/ml para nitroprussiato de sódio.

3.12 – Avaliação da modulação autonômica cardiovascular no domínio do tempo e da frequência (análise espectral)

A partir do registro basal dos animais acordados, foi possível utilizar a ferramenta de análise tempo-frequência da variabilidade da pressão arterial (VPAS) e da variabilidade da frequência cardíaca (VFC). Os parâmetros para análise no domínio do tempo consistiram em calcular os valores médios da PAS e FC, sendo as suas variabilidades quantificadas pela média dos desvios padrão. A análise no domínio da frequência constituiu da decomposição do sistograma pela Transformada Rápida de Fourier. Após esse remodelamento matemático, foram obtidas as potências absolutas da banda de baixa frequência (BF, 0,15-0,75 Hz) (SOARES *et al.*, 2004). A variabilidade do intervalo de pulso (VIP) foi obtida pela análise do tacograma a partir do registro da PAS, onde a frequência dos batimentos foi determinada pelo intervalo entre dois picos sistólicos.

Para análise da VIP e VPA no domínio da frequência, as séries temporais foram armazenadas em forma de texto para posterior análise pelo programa Cardioseries 2.4 utilizando-se da transformada rápida de Fourier (FFT) para decomposição dos sinais de onda em espectros de potência.

Para essa análise foram utilizados registros estáveis de 30 minutos de duração e com frequência de amostragem de 2000 Hz. Além do componente de baixa frequência, outro componente foi obtido na análise espectral: alta frequência (AF, 0,75-3,0 Hz). O componente BF é usado como um índice da atividade simpática. O componente AF é usado como um índice da atividade parassimpática. A relação BF/AF indica o balanço simpato-vagal (PAGANI *et al.*, 1988; PAGANI *et al.*, 1989).

3.13 – Avaliação de Resistência a Insulina (ITT)

Passadas 24 horas após os registros, os animais foram mantidos em jejum por 2 horas e anestesiados com pentobarbital sódico [10mg/Kg] para avaliação da resistência à insulina.

Os animais receberam uma injeção endovenosa 0,75U/kg de insulina. Nos tempos 0, 4, 8, 12 e 16 minutos após a injeção de insulina, a glicose plasmática foi medida a partir de amostras de sangue obtidas da veia caudal utilizando-se do glicosímetro portátil (Accucheck, Roche). Os valores de glicemia dos minutos 4 a 16 foram usados para calcular a constante de queda da glicose sanguínea (KITT) (BONORA *et al.*, 1989).

3.14 – Eutanásia e processamento do coração

Ao final dos experimentos, os animais de todos os grupos foram submetidos à eutanásia por decapitação em guilhotina. Seguimos a recomendação da Comissão de Ética da Universidade de São Paulo e dos Princípios Éticos na Experimentação Animais adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), conforme a Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) nº 714 de Junho de 2002. Não utilizou-se protocolo anestésico para que não houvesse interferência nas medidas realizadas.

Após a decapitação, o coração foi imediatamente removido. Um fragmento do ventrículo esquerdo foi destinado às análises histomorfométricas e o restante do órgão

foi lavado em solução gelada 0,9% de Cloreto de Sódio (NaCl), pesados, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C para futuras avaliações.

Amostras de tecido cardíaco de ratos de todos os grupos estudados foram fixadas em formalina por 24 horas. A seguir, foram seguidos os procedimentos de rotina para desidratação, diafanização e inclusão do tecido cardíaco em parafina. Usando-se o microtómo, foram obtidos cortes histológicos de 4µm de espessura apoiados sobre lâminas de vidro.

Os corpos dos animais foram acondicionados em sacos plásticos, devidamente identificados e armazenados em freezer -20°C para posterior coleta pela Prefeitura do Estado de São Paulo.

3.15 – Análise histomorfométrica: avaliação de Colágeno fibrilar, Sindecan-4, Glipican-1 e FGF2

Para análise histológica de rotina, os cortes foram corados com Hematoxilina e eosina.

Para o estudo do colágeno fibrilar, os cortes histológicos foram desparafinados, hidratados e corados durante uma hora em uma solução 0,1% de Sirius Red (Sirius Red F 3 B 200, Mobay Chemical Co. Union, New Jersey, EUA) em solução saturada aquosa de ácido pícrico. Os cortes foram rapidamente lavados em água corrente e contracorados com hematoxilina de Harris por 5 minutos. Com a coloração pelo Picrossírius é possível a identificação do colágeno fibrilar que adquire uma intensa coloração vermelha quando analisado sob luz convencional.

Para as reações de imunoistoquímica, os cortes histológicos foram desparafinizadas em 3 banhos e xilol e reidratadas em 3 banhos de álcool 100%, 2

banhos de álcool 95% e 1 banho em álcool 70%. A recuperação dos sítios antigênicos foi realizada em tampão citrato, ph = 6,0 por 2 minutos de pressão a 121 psi na panela tipo PASCAL (DAKO Cytomation, Carpinteria, USA). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com 2 banhos de 20 minutos com peróxido de hidrogênio 6%, em seguida os cortes foram mantidos por 30 minutos com CAS Block (Invitrogen; Life Technologies, CA, EUA) em temperatura ambiente para suprimir as ligações proteicas não específicas dos reagentes. Os anticorpos primários foram mantidos por 2 horas a 26°C, diluídos em reagente específico (Antibody Diluent Reagent Solution, Invitrogen - Life Technologies, CA, EUA). Como anticorpo secundário foi utilizando o kit Picture Max (Invitrogen; Life Technologies, CA, EUA), na diluição 1:30 para anti-Glipican, 1:75 para anti-Sindecan e 1:100 para anti-FGF2. A reação foi revelada com 3'-3' diaminobenzidino tetracloreto (DAB; DAKO), resultando em um precipitado de cor castanha nos locais com a presença de antígeno. Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harrys; em seguida as lâminas foram montadas com meio de montagem específico e lamínula de vidro. Controles positivos e negativos foram tratados como descrito acima, mas os controles negativos receberam somente a solução de diluição do anticorpo durante a incubação com o anticorpo primário.

Os cortes histológicos corados com Picrossirius e os preparados resultantes da imunoistoquímica foram "escaneados" pelo sistema Scancope (Aperio Technologies Inc., Vista, CA, USA) e a avalição morfométrica das áreas teciduais ocupadas tanto pelo colágeno como pela marcação imunoistoquimica foi realizada em 5 campos para cada corte, com auxílio do programa de análise de imagem Spectrum (AperioTechonologies, Inc.). Os resultados para a avaliação morfométrica estão apresentados como mediana, e amplitude inter-quartis (25% e 75%), dos animais controles (grupo C) à qual foi atribuído o valor 1,00.

3.16 – Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média ou mediana e amplitude interquartil. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade. Os dados foram comparados por teste *t* de *Student* ou Mann-Whitney e análise de variância (ANOVA) uma e duas vias, com *post test* Student Newman-Keuls. $p<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

4 – RESULTADOS

Avaliações Metabólicas

4.1 – Peso corporal

A Tabela 1 mostra o peso corporal de todos os grupos estudados no início e final do protocolo. No início, todos os grupos apresentavam pesos semelhantes. Ao final do estudo, os grupos C e CR apresentaram ganho de peso em relação à avaliação inicial e os grupos diabéticos D e DR apresentaram peso corporal menor quando comparados aos grupos controle (Figura 8).

Tabela 1 – Peso corporal dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8) no inicio e no final do protocolo.

Peso (g)	**Inicial**	**Final**	**Delta**
C	366 ± 14,5	546 ± 14,5‡	180,0 ± 12,47
CR	358,25 ± 7,95	511,0 ± 7,98‡	152,7 ± 0,25
D	320,62 ± 10,13	340,0 ± 19,67*#	19,37 ± 17,57
DR	359,25 ± 15,72	349,37 ± 26,18*#	-9,87 ± 24,15

Dados representam média ± EPM. ***** p<0,05 vs. C, **#** p<0,05 vs. CR, ‡ p<0,05 vs. mesmo grupo no início.

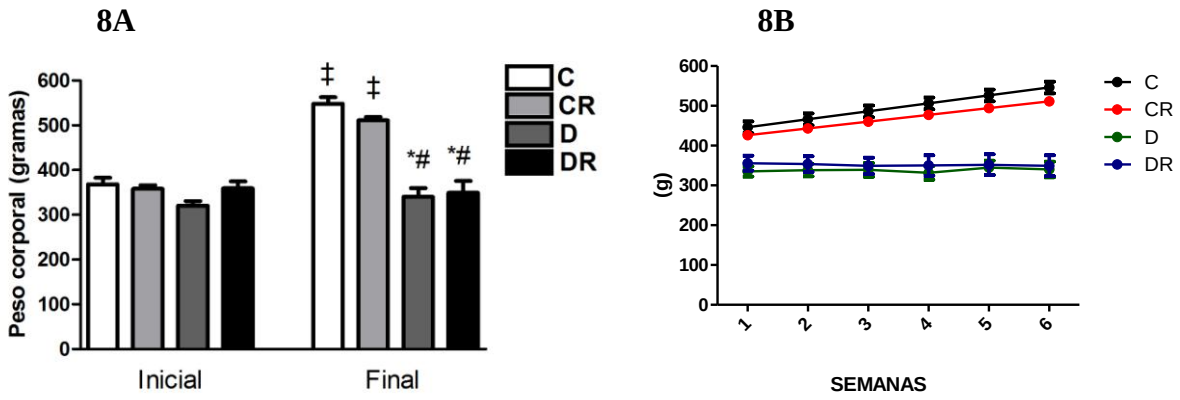

Figura8. 8A – Peso corporal dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8). * p<0,05 vs. C, # p<0,05 vs. CR, ‡ p<0,05 vs. inicial do mesmo grupo. **8B** – Curva de ganho de peso ao longo do protocolo mostra o ganho ascendente de peso dos grupos C e CR enquanto os grupos D e DR mostram-se com peso estável.

4.2– Índice de massa corpórea (Índice de Lee)

Na Tabela 2 estão mostrados os dados colhidos para o índice de Lee.

Tabela 2 – Índice de Lee dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8).

	C	**CR**	**D**	**DR**
Lee	0,317 ± 0,002	0,318 ± 0,003	0,298 ± 0,002*#	0,294 ± 0,006*#

Dados representam média ± EPM.* p<0,05 vs. C, # p<0,05 vs. CR.

Na Figura 9 são apresentados os resultados do índice de Lee ao final do protocolo dos grupos estudados onde foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos controles (C e CR) comparado aos grupos diabéticos (D e DR).

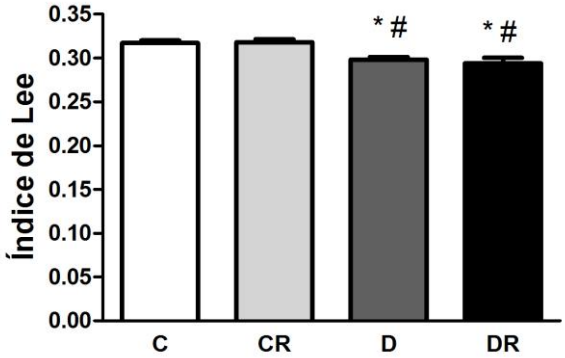

Figura 9. Índice de Lee dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8).* p<0,05 vs. C, # p<0,05 vs. CR.

4.3 – Glicemia e Triglicerídeos

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para as dosagens de glicose plasmática e triglicerídeos.

Tabela 3 – Glicemia, Triglicerídeos dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8) início e final do protocolo**.**

		Inicial	**Final**
Glicemia (mg/dL)	**C**	96 ± 2,97	95,75 ± 3,02
	CR	97,5 ± 3,0	93,63 ± 1,78
	D	346,9 ± 24,76*#	447,9 ± 35,07*#‡
	DR	390,3 ± 31,73*#	485,0 ± 17,76*#‡
Triglicerídeos (mg/dL)	**C**	90,43 ± 7,78	100,9 ± 2,97
	CR	98,57 ± 7,59	97,0 ± 6,93
	D	86,0 ± 5,08	131,3 ± 9,48*#‡
	DR	97,14 ± 7,57	129,20 ± 11,02*#‡

Dados representam média ± EPM. * p<0,05 vs. C, # p<0,05 vs. CR, ‡ p<0,05 vs. inicial do mesmo grupo.

No início e final do protocolo os valores de glicemia estavam aumentados nos grupos diabéticos (D e DR) em relação aos grupos controles (C e CR). Adicionalmente ao final do protocolo, os grupos diabéticos apresentaram aumento da glicemia em relação aos seus valores iniciais (Figura 10).

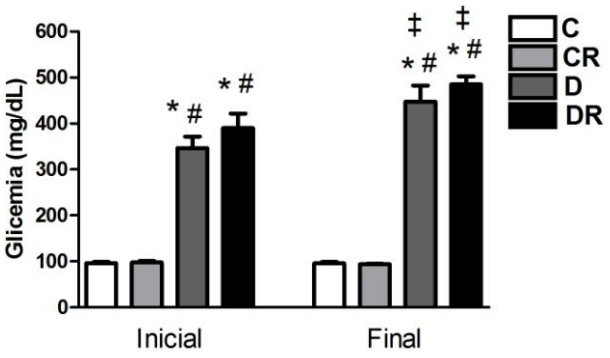

Figura10. Glicemia dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8). * p<0,05 vs. CE, # p<0,05 vs. CR, ‡ p<0,05 vs. inicial do mesmo grupo.

Os níveis de triglicerídeos dos grupos C e CR permaneceram dentro da faixa de normalidade durante todo o protocolo. Os animais dos grupos diabéticos (D e DR) apresentaram aumento significativo dos níveis de triglicerídeos ao final do estudo quando comparado aos grupos controles e seus valores iniciais (Figura 11).

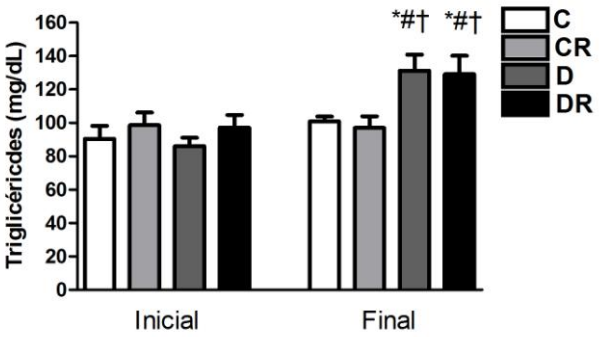

Figura 11. Triglicerídeos dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8). * p<0,05 vs. C, # p<0,05 vs. CR, † p<0,05 vs. inicial do mesmo grupo.

4.4 – Dosagem de Insulina

A Tabela 4apresenta os valores de insulina de todos os grupos, dosada no início (antes da indução do diabetes) e ao final do protocolo.

Tabela 4 – Dosagem de Insulina dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8) início e final do protocolo**.**

		Inicial	**Final**
	C	0,20 ± 0,03	1,40 ± 0,15 ‡
	CR	0,28 ± 0,1	0,90 ± 0,11 *‡
Insulina (mg/dL)	**D**	0,42 ± 0,07	0,27 ± 0,06 *#
	DR	0,29 ± 0,07	0,24 ± 0,07 *#

Dados representam média ± EPM. * p<0,05 vs. C, # p<0,05 vs. CR, ‡ p<0,05 vs. inicial do mesmo grupo.

Não foram observadas diferenças na concentração plasmática de insulina dos animais no início do protocolo. Entretanto, ao final do protocolo os grupos diabéticos (D e DR) apresentaram redução de insulina em relação aos grupos controle (C e CR), os quais apresentaram aumento em relação aos seus valores iniciais (Figura 12).

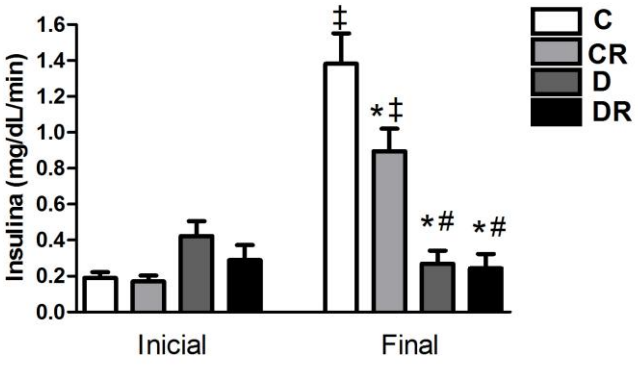

Figura 12. Insulina dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8). * p<0,05 vs. C, # p<0,05 vs. CR, ‡ p<0,05 vs. inicial do mesmo grupo.

4.5 – Teste de tolerância à insulina (ITT)

Os resultados observados no teste de tolerância à insulina realizados ao final do protocolo estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Constante de decaimento da glicose nos animais dos grupos controle (C n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=7) e diabético resveratrol, no final do protocolo (DR, n=8).

	C	**CR**	**D**	**DR**
KITT (%/min)	4,46 ± 0,24	3,8 ± 0,27	1,81 ± 0,17*#	2,56 ± 0,21*#¥

Dados representam média ± EPM. * p<0,05 vs. C, # p<0,05 vs. CR, ¥ p<0,05 vs. D.

Os animais dos grupos D e DR apresentaram menor KITT (constante de decaimento da glicose) no teste de tolerância à insulina quando comparados aos grupos controle C e CR. Todavia, o grupo DR apresentou melhor sensibilidade à insulina que a observada no grupo D (Figura 13).

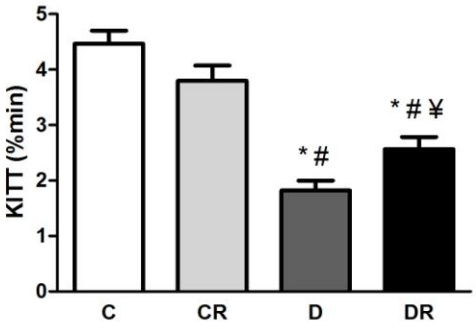

Figura 13. Teste de tolerância à insulina (ITT) dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8). Dados representam médias ± EPM. * p<0,05 vs. C, # p<0,05 vs. CR; ¥ p<0,05 vs. D.

Avaliações Ecocardiográficas

4.6 – Morfometria cardíaca

Na Tabela 6 são apresentados os parâmetros morfométricos do ventrículo esquerdo dos grupos, C, CR, D e DR. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos para massa do VE, diâmetros, e espessura relativa da parede ao final do protocolo.

Tabela 6– Parâmetros morfométricos do ventrículo esquerdo dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8) ao final do protocolo. ERP = espessura relativa da parede.

Avaliações Ecocardiográficas	**C**	**CR**	**D**	**DR**
Massa VE (corrigida)	1,19 ± 0,02	1,14± 0,01	1,10 ± 0,01	1,12 ± 0,03
Diâmetro do VE Diástole	0,86 ± 0,01	0,83 ±0,02	0,83 ± 0,02	0,79 ± 0,01
Diâmetro do VE Sístole	0,54 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,49 ± 0,02
ERP	0,31 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,32 ± 0,01

Dados representam média ± EPM.

4.7 – Função cardíaca

A avaliação da função cardíaca é representada na Tabela 7.

Tabela 7 – Função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo; Velocidade de encurtamento circunferencial (VEC); Relação pico da onda E com pico da onda A (relação E/A), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e Índice de performance miocárdica (IPM) dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8) ao final do protocolo.

Avaliações Ecocardiográficas	**C**	**CR**	**D**	**DR**
Fração de Ejeção (%)	75,06 ±0,86	73,79 ± 1,65	76,38 ± 1,67	73,56 ± 1,95
Fração de Encurtamento (%)	37,11 ± 0,74	36,20 ± 1,33	38,43 ± 1,48	37,63 ± 2,07
VEC (circ/seg*100)	0,45 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,40 ± 0,02#	0,38 ± 0,02#
Relação E/A	2,07 ± 0,17	2,01 ± 0,17	1,52 ± 0,07*#	1,51 ± 0,11*#
TRIV (ms)	29,37 ± 1,41	29,62 ± 0,59	38 ± 1,87*#	38,11 ± 2,74*#
Desaceleração onda E (ms)	47,14 ± 3,15	42,42 ± 1,99	54,12 ± 1,61#	50,55 ± 3,27
IPM	0,37±0.01	0,42±0,01	0,53±0.04*	0,47±0.04

Dados representam média ± EPM. ***** p<0,05 vs. C, # p<0,05 vs. CR.

Função Diastólica e Sistólica do Ventrículo Esquerdo

Os dois grupos diabéticos apresentaram redução da relação E/A, e aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) em relação aos dois grupos controles (Figura 14 e Tabela 7).

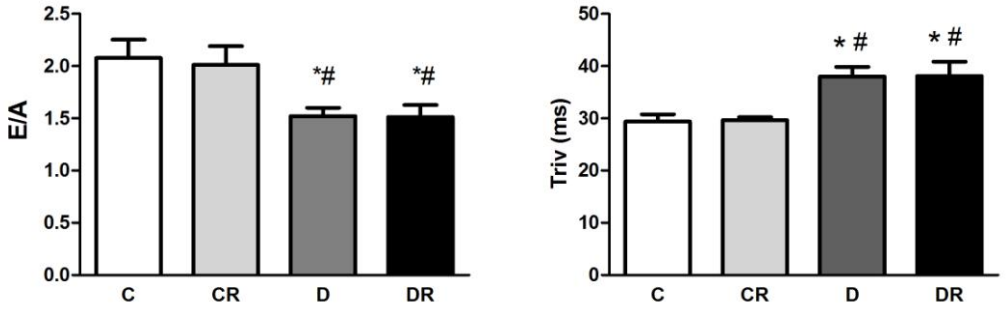

Figura 14. Relação pico da onda E com pico da onda A (relação E/A) e tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8). ***** p<0,05 vs. C, # p<0,05 vs. CR.

Todavia, quando avaliamos a velocidade de encurtamento circunferencial (VEC), os grupos D e DR apresentaram redução quando comparado ao grupo CR.

A desaceleração da onda E estava aumentada apenas no grupo D em relação ao grupo CR e o índice de performance miocárdica (IPM) estava aumentado em relação ao grupo C (Figura 15 e Tabela 7).

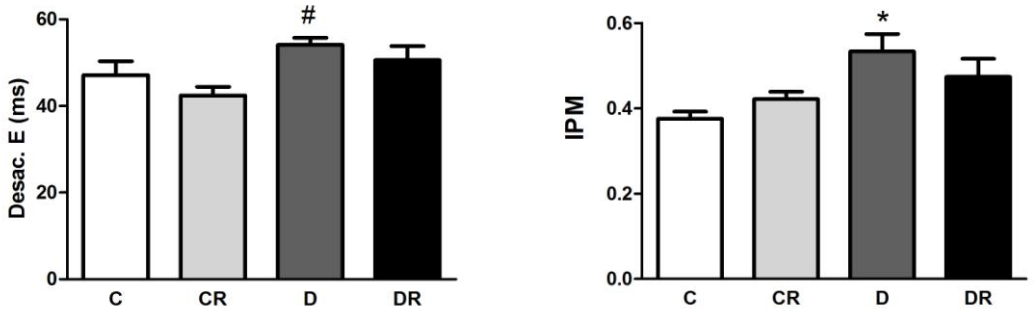

Figura 15. Desaceleração da onda E e índice de performance miocárdica (IPM) dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8). ***** p<0,05 vs. C, # p<0,05 vs. CR.

4.8 – Pressão Arterial e Frequência cardíaca de repouso

Os dados obtidos durante o Registro da Pressão Arterial direta e frequência cardíaca estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 – Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8) ao final do protocolo.

	C	**CR**	**D**	**DR**
PAS	133,71 ± 1,48	134,82 ± 2,43	116,2 ± 2,28*#	119,62 ± 3,82*#
PAD	94,14 ± 1,26	93,94 ± 1,85	83,77 ± 2,35*#	88,94 ± 3,46
PAM	111,13 ± 1,30	111,76 ± 2,20	100,2 ± 2,53*#	105,09 ± 4,04
FC	327,20 ± 4	324,45 ± 12,85	288,7 ± 8,88*#	286,61 ± 6,54*#

Dados representam média ± EPM. * $p<0,05$ vs. C, # $p<0,05$ vs. CR.

O diabetes promoveu diminuição da PAS e da FC nos grupos D e DR em relação aos grupos controles C e CR, entretanto a PAD e PAM estavam diminuídas apenas no grupo D em relação aos grupos C e CR. Desta forma, a administração de resveratrol para os animais diabéticos foi eficaz em normalizar a hipotensão observada no grupo D, já que seus valores não são diferentes dos grupos controle (Figura 16). Entretanto a frequência cardíaca que era menor no grupo D não retornou aos valores controles após o resveratrol.

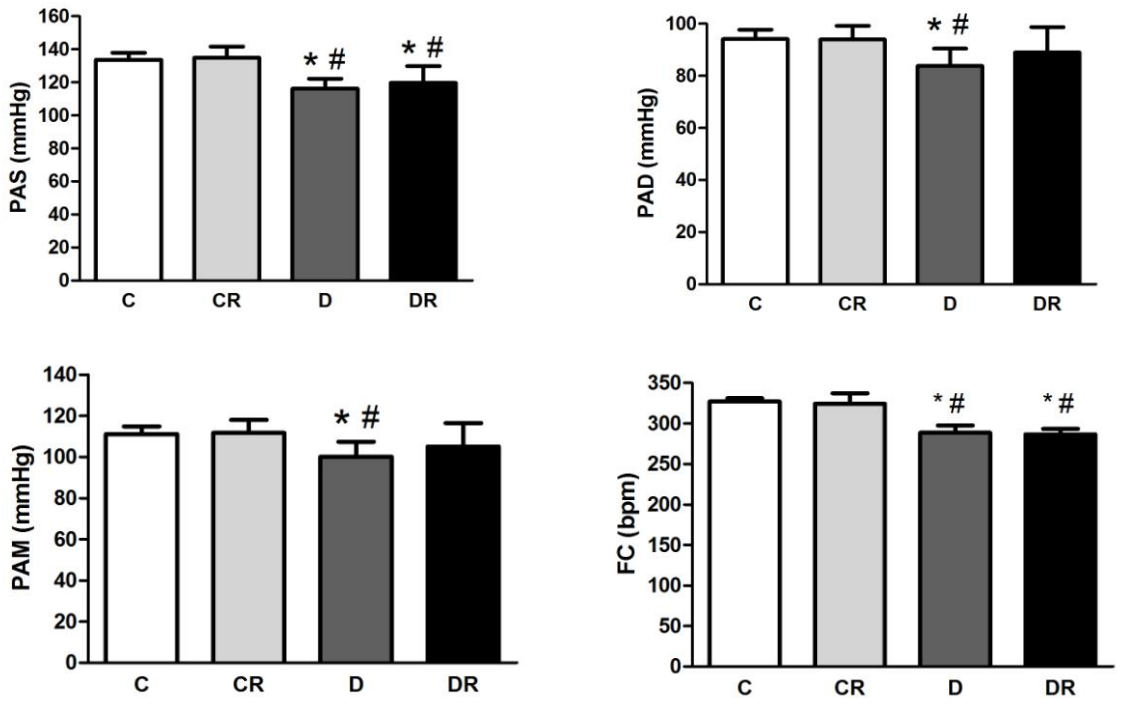

Figura 16. (PAS) Pressão arterial sistólica, (PAD) Pressão arterial diastólica, (PAM) Pressão arterial média e (FC) Frequência cardíaca dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8). Dados representam média ± EPM. * $p<0,05$ vs. C, # $p<0,05$ vs. CR.

4.9 – Sensibilidade barorreflexa

Os dados de sensibilidade dos baroreceptores estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 – Sensibilidade dos Pressorreceptores dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8) ao final do protocolo.

	C	**CR**	**D**	**DR**
Resposta Bradicárdica (bpm/mmHg)	-1,56 ± 0,15	-1,79 ± 0,23	-2,19 ± -0,34	-1,62 ± 0,23
Resposta Taquicárdica (bpm/mmHg)	3,07 ± 0,20	2,58 ± 0,23	3,59 ± 0,38	2,75 ± 0,37

Dados representam média ± EPM.

Não foram observadas diferenças significativas para a sensibilidade barorreflexa tanto para respostas bradicárdicas como para taquicárdicas entre os grupos C, CR, D e DR ao final do protocolo. (Figura 17).

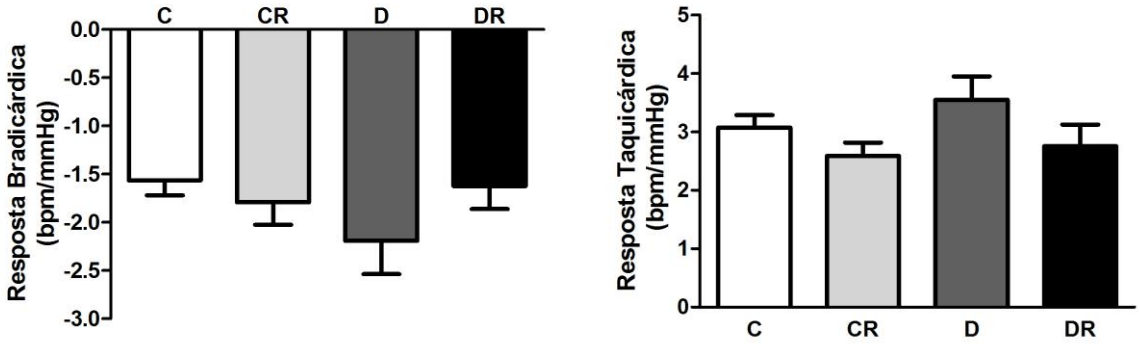

Figura 17. Sensibilidade Barorreflexa dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8).

4.10 – Avaliações do controle autonômico da frequência cardíaca no domínio do tempo e da frequência

Os resultados da variabilidade da frequência cardíaca estão mostrados na Tabela 10 e na Figura 18.

Tabela 10 – Variabilidade da frequência cardíaca dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8) ao final do protocolo.

	C	CR	D	DR
IP (ms)	188,5 ± 2,94	190,80 ± 3,88	207,40 ± 5,93*#	211,10 ± 5,05*#
DP IP (ms)	6,63 ± 0,42	7,00 ± 0,29	6,50 ± 0,54	6,29 ± 0,49
Variância (ms^2)	45,13 ± 5,43	49,57 ± 4,05	44,17 ± 6,59	41,14 ± 5,82
RMSSD (ms)	5,41 ± 0,55	6,31 ± 0,62	7,64 ± 0,89	7,02 ± 0,69
HF abs. (ms^2)	9,47 ± 1,98	9,38 ± 1,24	13,76 ± 2,18	13,08 ± 3,00
LF abs. (ms^2)	4,88 ± 0,96	3,95 ± 0,64	5,18 ± 0,82	3,91 ± 0,66
HF un IP	70,13 ± 2,96	74,38 ± 3,41	76,50 ± 2,41	78 ± 4,91
LF un IP	29,88 ± 2,96	25,63 ± 3,41	23,50 ± 2,41	22 ± 4,91
HF (%) IP	29,50 ± 1,57	34,38 ± 4,39	41,71 ± 2,67	39,86 ± 5,09
LF (%) IP	11,88 ± 1,65	10 ± 1,51	12,38 ± 1,33	10,50 ± 1,60

Dados representam média ± EPM. * p<0,05 vs. C, # p<0,05 vs. CR

O intervalo de pulso nos grupos D e DR foram maiores em relação aos grupos C e CR (Tabela 10), confirmando o achado de redução da FC basal nesses grupos.

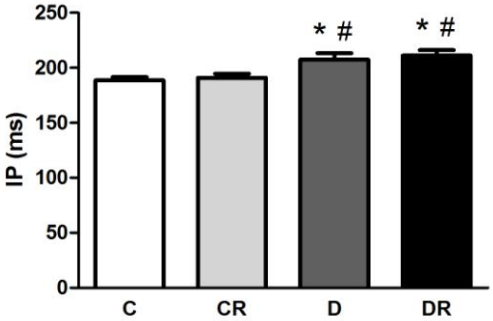

Figura 18. IP dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8). * p<0,05 vs. C, # p<0,05 vs. CR.

4.11 – Variabilidade da pressão arterial sistólica

A variabilidade da pressão arterial sistólica é apresentada na Tabela 11.

Tabela 11 – Variabilidade da pressão arterial; Desvio Padrão da Pressão Arterial Sistólica (DP PAS), Variância da Pressão Arterial Sistólica (VAR PAS) e Banda de baixa Frequência (low frequency) (LF PAS) dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8) ao final do protocolo.

	C	**CR**	**D**	**DR**
DP PAS (mmHg)	7,22 ± 0,36	7,76 ± 0,42	5,69 ± 0,33*#	5,44 ± 0,64*#
VAR PAS ($mmHg^2$)	48,63 ± 6,15	61,57 ± 6,61	30,14 ± 3,21*#	25,73 ± 4,53*#
LF PAS ($mmHg^2$)	5,68 ± 0,93	4,53 ± 0,65	2,85 ± 0,48*	2,41 ± 0,51*

Dados representam média ± EPM. *p<0,05 vs. C, # p<0,05 vs. CR.

Foi observada diminuição do DP da PAS nos grupos D e DR em relação aos grupos C e CR. O mesmo comportamento foi observado para variância da PAS (Figura 19).

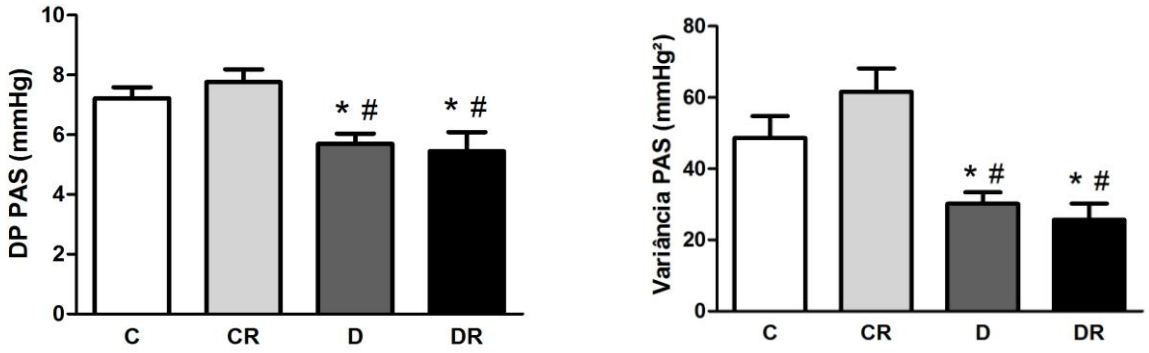

Figura 19. DP e variância da PAS dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8). * p<0,05 vs. C, # p<0,05 vs. CR.

A banda de baixa frequência da PAS (LF) estava reduzida nos grupos diabéticos (D e DR) em relação aos animais controle (Figura 20).

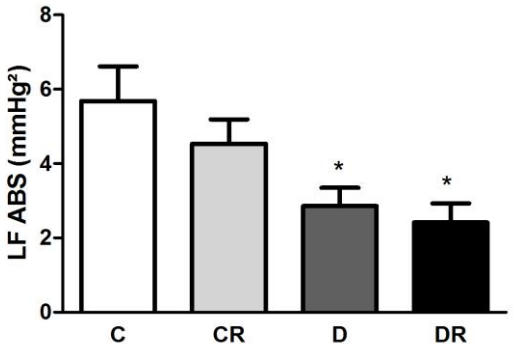

Figura 20. LF absoluto dos grupos: controle (C, n=8), controle resveratrol (CR, n=8), diabético (D, n=8), diabético resveratrol (DR, n=8). * p<0,05 vs. C.

4.12 – Avaliação Imunohistoquímica para proteoglicanos de superfície e FGF2

A marcação imunoistoquímica mostrou-se adequada nas diluições realizas e foi possível realizar sua quantificação automatizada para os três anticorpos utilizados. Os resultados (normalizados em relação ao controle, que passa a valer 1) estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Dados quantitativos de prevalência de marcação imunoistoquímica para Glipican 1, Sindecan 4 e FGF2.

	C	**CR**	**D**	**DR**
Glipican-1	1.00 (0.67-1.52)	1.45 * (1.21-1.76)	1.81 * (1.33-2.24)	1.31 ¥ (1.09-1.80)
Sindecan-4	1.00 (0.78-1.40)	2.59 * (1.97-2.97)	5.41*# (4.79-7.47)	0.96 #¥ (0.63-1.65)
FGF2	1.00 (0.58-1.51)	0,91 (0.71-1.11)	2.59 *# (2.23-3.63)	1.59 #¥ (1.15-2.15)

Os valores estão apresentados em mediana e amplitude interquartil (25 e 75%).
Mann-Whitney test, *p<0,05 vs. C**, #** p<0,05 vs. CR, ¥ p<0,05 vs D.

Na figura 21 podemos observar os resultados da reação de imunohistoquimica para Glypican-1, Syndecan-4 e FGF2.

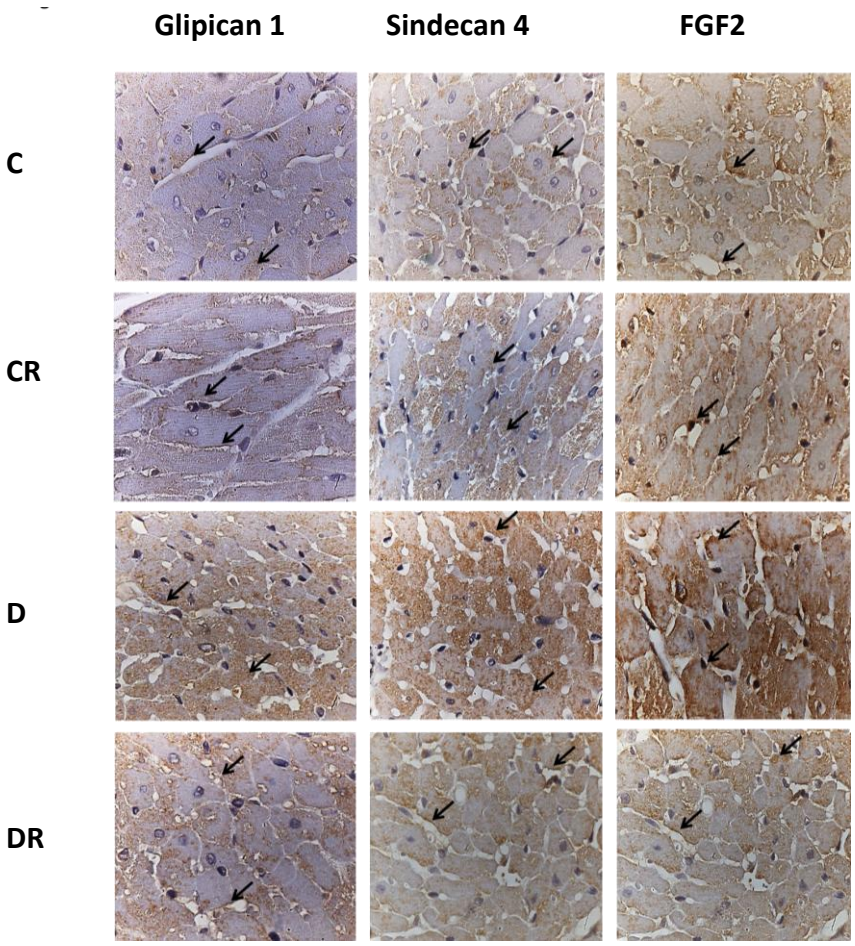

Figura 21. Reação de imunoistoquímica para Glipican 1, Sindecan 4, e FGF2 dos grupos: controle (C), controle resveratrol (CR), diabético (D), diabético resveratrol (DR). As setas mostram a marcação positiva de coloração castanha na superfície celular. Objetiva: 100x.

4.13 – Avaliação do Colágeno Fibrilar

Os dados morfométricos estão mostrados na Tabela 13 e representam (em porcentagem) a área ocupada por colágeno fibrilar no miocárdio. É possível observar que o tratamento com RSV leva à diminuição da área ocupada pelo colágeno tanto no animal diabético como no animal controle.

Tabela 13 – Dados quantitativos da área tecidual ocupada por colágeno fibrilar.

	C	**CR**	**D**	**DR**
Colágeno fibrilar (%)	4,6 (3,2 – 5,2)	3,3* (0,3 – 6,9)	6,4*# (3,3 – 17,5)	3,5*¥ (1,6 – 6,1)

Os valores estão apresentados em mediana e amplitude interquartil (25 e 75%). Mann-Whitney test, *p<0,05 vs. C**, #** p<0,05 vs. CR, ¥ p<0,05 vs D.

A Figura 22 mostra os achados nos preparados histológicos corados com o Picrossírius-hematoxilina. O colágeno fibrilar aparece corado em vermelho profundo entremeado às células musculares cardíacas.

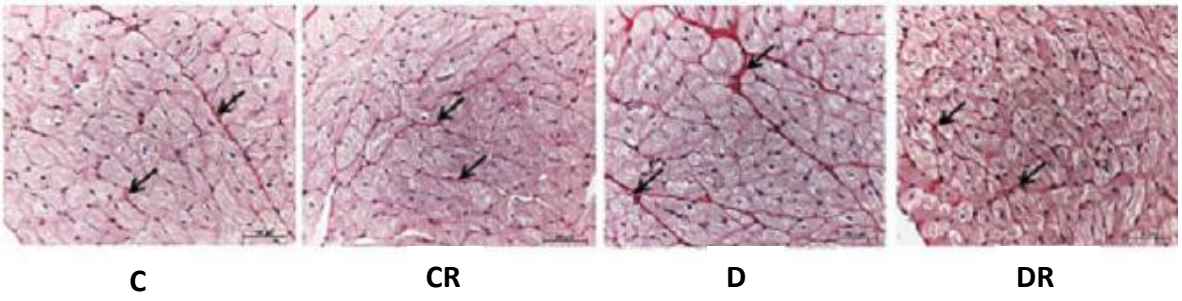

Figura 22. Cortes histológicos corados com Picrossírius-hematoxilina. As setas apontam para fibras colagênicas presentes no espaço intercelular dos grupos: controle (C), controle resveratrol (CR), diabético (D), diabético resveratrol (DR). Observar que a maior quantidade de colágeno está presente no grupo D e que o grupo DR apresenta-se semelhante aos grupos C e CR. Objetiva: 40x.

DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

Os principais resultados desse trabalho foram:

O Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina + nicotinamida provocou redução do ganho de peso ao longo de nove semanas assim como, hiperglicemia, aumento dos triglicérides, redução de insulina plasmática e redução da constante de decaimento de glicose, indicando que o modelo escolhido apresenta as características esperada nesse quadro.

O RSV modificou muito pouco esse quadro metabólico apresentado pelos animais diabéticos. Além disso, não foi capaz de modificar a disfunção diastólica observada nos diabéticos. Entretanto, o RSV promoveu a melhora do índice global de função cardíaca representado pelo IPM.

As alterações hemodinâmicas observadas confirmam dados anteriores de redução da PA e da FC, acompanhada de redução da variabilidade de PA bem como de seu componente de baixa frequência (LF) nos animais diabéticos (DE ANGELIS et al., 2000). O RSV não mudou esse quadro hemodinâmico.

Em relação aos animais não tratados, a administração do RSV foi capaz de proteger o animal diabético contra a deposição de grande quantidade de colágeno no miocárdio e contra o aumento de expressão de FGF2, Glipican-4 e Sindecan-1 na membrana plasmática do cardiomócito.

5. 1 – Parâmetros metabólicos

Encontramos na literatura dados que confirmam que o diabetes causa a perda de peso gradual em ratos (ANDERSON & GARNER, 1997; SQUADRITO *et al*., 2003). Até o final do nosso estudo, os grupos diabéticos não ganharam peso, ao contrário dos animais controles. Sendo o resveratrol um polifenol, ou seja, um composto vegetal com semelhança estrutural e funcional ao estrógeno (fitoestrógeno), e, levando-se em consideração, que o estrogênio aumenta o consumo energético, nosso achado de que o grupo DR perdeu mais peso que o grupo D no decorrer do protocolo parece justificável. No entanto, não observamos diferenças nos pesos médios finais dos dois grupos.

Nossos resultados demonstraram que o consumo do RSV não diminuiu os níveis glicêmicos no grupo DR, se mantendo semelhante aos do grupo D. Este fato pode ser devido à baixa concentração plasmática de insulina medida no final do protocolo em ambos os grupos.

Em contraste com nossos resultados GENCOGLU *et al.* (2015) observaram que ratos diabéticos tratados com RSV perderam menos peso corporal, com redução da glicemia e melhora da tolerância a insulina. No presente estudo, o RSV não apresentou efeito sobre a hiperglicemia, mas melhorou a sensibilidade à insulina no grupo DR, de acordo com os resultados do teste de tolerância a insulina (ITT).

Em humanos, utiliza-se o índice de massa corpórea (IMC) para verificar se os níveis de gordura e peso estão dentro da faixa recomendada pela Organização Mundial de Saúde. Em animais de experimentação utiliza-se o índice de Lee, que equivale ao IMC obtido em humanos. Este índice é usado para determinar, de forma rápida, a obesidade em ratos submetidos a um método de ganho de peso. No presente estudo, os

grupos diabéticos apresentaram menor índice de Lee que os controles, devido a perda de peso durante o protocolo.

Em nosso estudo observamos que os níveis de triglicérides nos animais diabéticos com ou sem tratamento com RSV estava aumentado no final do protocolo. No entanto, estes dados estão em conflito com aqueles de D'ARCHIVIO *et al.* (2007) que mostraram níveis menores de triglicérides em animais diabéticos tratados com RSV, usando o mesmo protocolo de experimental.

5. 2 – Avaliação da morfometria e função cardíacas

A cardiomiopatia diabética é uma doença do músculo cardíaco não relacionada à patologia vascular e valvular ou à hipertensão arterial sistêmica. Acredita-se que a cardiomiopatia diabética seja decorrente de anormalidades metabólicas como hiperlipidemia, hiperinsulinemia e hiperglicemia. Tais alterações podem causar aumento do estresse oxidativo, fibrose intersticial, perda celular e comprometimento do trânsito intracelular de íons e da homeostase do cálcio (DE ANGELIS *et al.*, 2000).

No diabetes experimental, induzido por STZ a redução da contratibilidade, a diminuição da complacência ventricular e o aumento da pressão diastólica final, tem sido associados à disfunção ventricular (FEIN *et al*., 1980; DE ANGELIS *et al*., 2000; DOBRZYNSKY *et al*., 2002, AKULA *et al*., 2003).

Clinicamente, em diabéticos, é possível a detecção de disfunção diastólica assintomática mesmo antes de surgirem os sinais e sintomas de insuficiência cardíaca; de fato, a disfunção diastólica isolada pode ser observada precocemente, sendo que o comprometimento da função sistólica, habitualmente, é tardio.

Quando analisamos a morfometria VE, através do valor de sua massa, do seu diâmetro em diástole e da espessura relativa de sua parede, não observamos diferenças significativas entre todos os grupos. No entanto, encontramos alterações no TRIV e na relação E/A nos animais diabéticos que comprometem o relaxamento cardíaco. Nos animais diabéticos e tratados observou-se a manutenção desses parâmetros alterados.

Os dados da função sistólica, expressos pela fração de encurtamento e fração de ejeção, foram semelhantes entre os grupos, porém a velocidade de encurtamento circunferêncial mostrou-se menor nos grupos diabéticos mesmo com a administração do RSV.

Vê-se, portanto, que tanto os dados de função sistólica como diastólica tiveram seu padrão alterado nos animais diabéticos e que o tratamento com RSV manteve parâmetros normais de função cardíaca nas variáveis IPM e desaceleração da onda E.

E qual seria um possível mecanismo envolvido nesta proteção funcional mostrada pelo RSV? Para responder a esta pergunta devemos levar em consideração que o RSV também foi capaz de proteger o miocárdio contra a grande deposição de colágeno que foi observada nos animais diabéticos não tratados; desta forma, é possível que a presença de quantidades adequadas de colágeno intersticial tenha, por si mesma, contribuído para a melhora do relaxamento ventricular e portanto da função diastólica.

A disfunção diastólica na ausência de hipertensão detectada no grupo diabético pode ser associada com a cardiomiopatia diabética. De fato, a fibrose do coração diabético podem estar associada a modificações dos níveis de fatores de crescimento. No presente estudo, observou-se aumento de expressão do FGF2 (fator do crescimento do fibroblasto 2) no miocárdio diabético. Mais ainda, com tratamento com RSV, os níveis de FGF2 mostraram-se significativamente menores. De acordo com Pellieux e col. (2001), na hipertrofia cardíaca, diferentes estímulos podem levar os fibroblastos

cardíacos a secretar fatores de crescimento, incluindo o FGF2. O aumento de expressão do FGF2 no diabetes experimental tem sido descrito em diferentes tecidos, por vários autores, assim como o efeito inibitório do RSV na síntese do FGF2 (KARPEN *et al.*, 1992; PANUTSOPULOS *et al.*, 2003; VASKO *et al.*, 2009).

Uma vez secretadas, as moléculas de FGF2 se associam aos proteo heparan de membrana (como o sindecan e o glipican), portanto, parece haver uma sinergia na expressão dessas moléculas.

De fato, os resultados do presente estudo confirmam uma sinergia de resposta entre o FGF2 e a expressão de sindecam e glipicam, pois essas três moléculas, simultaneamente, estavam aumentadas no coração diabético e monstraram-se em níveis significativamente mais baixos após tratamento com RSV.

A expressão do sindecan está normalmente regulada para cima (*up regulated*) em resposta a estímulos pró inflamatórios em várias forma de doença cardíaca incluindo a cardiomiopatia diabética (STRUNZ *et al*., 2011). Enquanto a parte citoplasmática do sindecan regula a sinalização, sua estrutura extracelular, se liga a uma variedade de moléculas da matriz extracelular envolvidas na fibrose, a saber, os colágenos, os fatores de crescimento (como, por exemplo, o FGF2), citocinas e proteínas de adesão (LUNDE *et al.*, 2016). Isso fica claro pelos resultados obtidos em camundongos *knockout* para o sindecan, já que estes apresentam menor diferenciação dos miofibroblastos, função contrátil reduzida, ruptura cardíaca e morte (MATSUI *et al.*, 2011).

5.3 – Avaliações da função autonômica

Embora os mecanismos determinantes das alterações de pressão arterial ainda não estão perfeitamente esclarecidos em animais diabéticos, estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que estes apresentam redução da PA e da FC quando comparados aos controles (DEANGELIS et al., 2009, DE ANGELIS et al., 2000). No presente estudo obtivemos resultados semelhantes para os dois grupos diabéticos.

Para os parâmetros PAD E PAM observou-se também uma diminuição de valores nos animais diabéticos quando comparados com os controles. Porém, ratos diabéticos que receberam o RSV, obtiveram valores de PAD e PAM semelhantes àqueles dos grupos controles, o que demonstram uma ação benéfica do RSV.

A neuropatia autonômica é uma complicação frequente do diabetes mellitus e está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade em pacientes sintomáticos (DE ANGELIS *et al*., 2002; EWING *et al*., 1980). Em indivíduos diabéticos, a VFC pode preceder sintomas clínicos de disfunção autonômica. Estudos de nosso laboratório tem mostrado redução na sensibilidade barorreflexa, tônus simpático vagal e VFC em animais diabéticos por STZ (DE ANGELIS *et al*., 2002; SCHAAN *et al.*, 2004; TASK FORCE, 1996). É alta a prevalência de disfunção autonômica cardíaca em indivíduos com DM, sendo isso em parte responsável pela redução da expectativa de vida nos seus portadores. Cientes da importância clínica da disfunção autonômica presente no diabetes, avaliamos a sensibilidade barorreflexa e a variabilidade da FC nos nossos animais.

O controle barorreflexo da circulação é um dos mais importantes mecanismos de controle momento a momento da pressão arterial. De fato, o controle da VPAS pelo barorreflexo é a chave para a homeostase fisiológica. Além disso, pacientes diabéticos

com reflexos cardiovasculares normais têm menor mortalidade quando comparados àqueles que apresentam algum tipo de prejuízo na função reflexa autonômica (DE ANGELIS *et al*., 2009; EWING *et al.*, 1980).

No presente estudo, os animais diabéticos não mostraram redução da sensibilidade dos reflexos comandados pelos pressorreceptores (resposta bradicárdica e taquicardica). Esses resultados diferem dos encontrados na literatura onde há algumas demonstrações de que, em ratos, 5 dias de diabetes leva ao prejuizo no controle barorreflexo da FC, caracterizado pela redução da resposta de taquicardia, sem alteração de bradicardia; essas mudanças persitem até 80 dias após a indução diabetes (DE ANGELIS *et al*., 2002; HARTHMANN *et al.*, 2007). É provável que não tenhamos observado essas da sensibilidade baroreflexa pelo fato de termos optato pelo modelo de indução de diabetes associando nicotinamida à STZ. É sabido que a nicotinamida protege as células beta pancreáticas, minimizando o quadro de diabetes que se instala (SZKUDELSKI, 2012).

O prejuízo da habilidade para adequadamente regular a FC durante mudanças na PA têm sido atribuído a algumas alterações na atividade cardíaca parassimpática; entretanto, mudanças na função dos receptores atriais muscarínicos ou na mediação central do reflexo barorreceptor não podem ser excluídas (DE ANGELIS *et al*., 2000; DE ANGELIS, K. *et al*., 2009; DALL'AGO *et al.*, 2007).

Estudo anterior do nosso laboratório demonstrou que o ramo eferente do reflexo comandado pelos pressorreceptores não é o principal responsável pela disfunção barorreflexa observada no diabetes por STZ em curto prazo (10-20 dias), já que, observamos que mesmo em presença de respostas reflexas reduzidas nos diabéticos, as respostas bradicárdicas são significativamente maiores quando produzidas pela estimulação direta do nervo vago ou por injeções de metacolina em ratos. O aumento da

bradicardia induzido pela injeção de metacolina poderia representar hipersensibilidade de receptores muscarínicos caracteristicamente observada em presença de redução da atividade parassimpática, como demonstrada em ratos diabéticos. Isso indicaria, portanto, que o sistema nervoso central deve ser o sítio da alteração no barorreflexo, uma vez que, não se observam alterações funcionais de aferência desses barorreceptores em ratos diabéticos por STZ (DALL'AGO *et al*., 2002).

Além da sensibilidade barorreflexa, a VFC e VPAS têm se tornado importantes ferramentas para o diagnóstico e prognóstico em muitas patologias, dentre elas o diabetes (GOTTSÄTER *et al*., 2006).

Em virtude da neuropatia autonômica, pacientes com diabetes mellitus normalmente apresentam uma reduzida habilidade de regular a FC, atribuída não só à dessensibilização barorreflexa, mas também à disfunção parassimpática cardíaca e/ou central. As injúrias causadas pelo diabetes ao sistema nervoso parassimpático podem levar à redução da VFC; assim sendo, este parâmetro alterado torna-se um importante índice de disautonomia nestes pacientes (DE ANGELIS, K. *et al*., 2009; PAGANI *et al.*, 1988).

No entanto, em nosso estudo não foram observadas alterações significativas da VFC nos grupos diabéticos. Isso se contrapõe com a literatura existente, pois parece haver um consenso no que diz respeito à redução da VFC no diabetes, demonstrada tanto em humanos, como em ratos induzidos por STZ e outros modelos de animais diabeticos (GOTTSÄTER *et al.*, 2006; FAZAN *et al*., 1997; FAZAN *et al*., 1999; MÉSANGEAU *et al.*, 2000), sendo que essa redução pode estar associada à duração e à gravidade do diabetes.

Já em relação à VPAS, observamos diminuição nos grupos diabéticos em relação aos grupos controles. Fazan e col. (1999) mostraram quedas mais acentuadas na

VFC de acordo com o tempo de indução do diabetes. Adicionalmente, os autores observaram também uma queda da VPAS somente nos animais diabéticos de 10 dias a 18 semanas de indução, não sendo observadas estas diferenças na fase aguda (5 dias). Neste estudo, o uso da nicotinamida pode ter atenuado as alterações usualmente observadas no modelo.

Em indivíduos saudáveis, situações de aumento da atividade simpática normalmente vêm acompanhadas do aumento, diminuição ou mesmo nenhuma alteração da banda LF (DE ANGELIS *et al*., 2009). Estudos com indivíduos diabéticos têm demonstrado uma significante redução da VFC, principalmente relacionada à redução dos dois componentes oscilatórios, LF e HF, mesmo na ausência de outras manifestações nos parâmetros cardiovasculares (GOTTSÄTER *et al*., 2006; FAZAN *et al.*, 1999). Neste estudo não constatamos a redução da banda de LF do IP entre os grupos. Porém, na literatura é bastante comum encontrarmos redução dos componentes oscilatórios (bandas de LF e HF) da PA e FC em pacientes diabéticos (GOTTSÄTER *et al*., 2006). Em estudo utilizando indivíduos diabéticos com neuropatia periférica, Yamamoto e col. (1999) evidenciaram significante redução das bandas LF e HF da VFC quando comparados com indivíduos não diabéticos pareados por idade. Além disso, os autores constataram, neste estudo, que os principais fatores relacionados à queda da banda LF eram a duração do diabetes bem como a elevação dos níveis de hemoglobina glicosilada nestes pacientes. É interessante notar que, essas alterações, por sua vez, estão correlacionadas, negativamente com os níveis de glicose plasmática, sugerindo que o aumento dos níveis glicêmicos esteja associado ao prejuízo da função autonômica para o coração nesse modelo (FAZAN *et al*., 1999; SCHAAN *et al*., 2004). Além disso, a redução da banda de LF tem sido correlacionada à progressão de ateroscleose em

indivíduos diabéticos tipo II, avaliada pela espessura íntima/média da carótida (GOTTSÄTER *et al*., 2006).

Adicionalmente, a banda de LF da PAS mostrou-se reduzida nos grupos diabéticos (D e DR) em relação aos controles (C e CR). A banda de LF da PA resulta de vários fatores neuro-humorais e funcionais, porém a maior influência deste componente é a modulação simpática (DE ANGELIS, K. *et al*., 2009; GUZZETTI *et al*., 2002). No presente estudo a redução da banda LF da VPA encontrada nos animais diabéticos corrobora os dados de Fazan e col. (1999) que mostraram uma redução dos componentes LF e HF (VFC e VPAS) nos animais diabéticos em relação aos controles.

CONCLUSÃO

6 – CONCLUSÕES

1- A administração de RSV tem um efeito protetor para o miocárdio de ratos diabéticos.

2- Os efeitos benéficos do RSV ocorrem na função diastólica, na função cardíaca global, na tolerância à insulina, na adequação da deposição de colágeno intersticial e da expressão dos proteo-heparans de membrana e FGF2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKULA, A.; KOTA, M. K.; GOPISETTY S. G. CHITRAPU R. V.; KALAGARA, M.; KALAGARA, S.; VEERAVALLI, K. K.; GOMEDHIKAM, J. P.; Biochemical, histological and echocardiographic changes during experimental cardiomyopathy in STZ-induced diabetic rats. *Pharmacol Res*. 2003; 48(5): 429-35.

ANDERSON, J. J. B.; GARNER, S. C. Phytoestrogens and human function. Nutrition Today. Hagerstown. V.32, n.6, p. 232-238. Dec. 1997.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes – 2014. Diabetes Care, 2014;37 Suppl 1:S14-80

BAUR, J. A., *et al.* Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v.444, n.7117, p.337-42. Nov 16, 2006.

BERTELLI, A. A. E.; GIOVANNINI, L.; GIANNESSI, D.; MIGLIORI, M.; BERNINI, W.; FRWGONI, M.; BERTELLI, A. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. International Journal of Tissue Reactions, Geneva, v.17(1), p.1-3, 1995.

BIGGER, J. T.; FLEISS, J. L.; STEINMAN, R. C.; ROLNITZKY, L. M.; SCHNEIDER, W. J.; STEIN, P. K. RR variability in healthy, middle-age persons compared with patients with chronic coronary heart disease or recent acute myocardial infarction. *Circulation*. 1995; 1; 91 (7): 1936-43.

BILATE, A. M., *et al.* The Syrian hamster as a model for the dilated cardiomyopathy of Chagas' disease: a quantitative echocardiographical and histopathological analysis. **Microbes Infect**, v.5, n.12, p.1116-24. Oct, 2003.

BOLLINENI, J. S., *et al.* Heparan sulfate proteoglycan synthesis and its expression are decreased in the retina of diabetic rats. **Curr Eye Res**, v.16, n.2, p.127-30. Feb, 1997.

BONORA, E., *et al.* Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab**, v.68, n.2, p.374-8. Feb, 1989.

BOUDINA, S. & E. D. ABEL. Diabetic cardiomyopathy revisited. **Circulation**, v.115, n.25, p.3213-23. Jun 26, 2007.

CARRIER, G. O.; ARONSTAM, R. S. Altered muscarinic receptor properties and function in the heart in diabetes. J Pharmacol Exp Ther. 1987; 242(2): 531-5.

CHEN, Y. Z.; WANG, J. S.; CHOW, S. E. Resveratrol protects vascular endothelial cell from ox-LDL-induced reduction in anitrombogenic activity. The Chinese Journal of Physiology, Taiwan, v. 50, s.1, p. 22-28, Feb. 2007.

COUCHMAN, J. R. & C. A. PATAKI. An introduction to proteoglycans and their localization. **J Histochem Cytochem**, v.60, n.12, p.885-97. Dec, 2012.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols dietary sources and bioavailability. Annali dell'Istituto superiore di sanitá, Roma, v.43, n.4, p.348-361, Oct. 2007.

DALL'AGO, P.; FERNANDES, T. G. MACHADO, U. F.; BELLÓ, A. A.; IRIGOYEN, M. C. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. Braz J Med Biol Res. 1997; 30(1): 119-24.

DALL'AGO, P.; DA SILVA, V. O.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. C.; FAZAN R.; SALGADO, H. C. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35(7): 843-9.

DALL'AGO, P.; D'AGORD, SCHAAN, B.; DA SILVA, V. O.; WERNER, J.; DA SILVA SOARES, P. P.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. C. Parasympathetic dysfunction is associated with baroreflex and chemoreflex impairment in streptozotocin-induced diabtes in rats. *Auton Neurosci.* 2007 Jan 30; 131 (1-2): 28-35.

DAS, D. K. & N. MAULIK. Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. **Mol Interv**, v.6, n.1, p.36-47. Feb, 2006.

DAS, S. & D. K. DAS. Resveratrol: a therapeutic promise for cardiovascular diseases. **Recent Pat Cardiovasc Drug Discov**, v.2, n.2, p.133-8. Jun, 2007.

DE ANGELIS, K. L. et al. Exercise training in aging: hemodynamic, metabolic, and oxidative stress evaluations. Hypertension, v. 30, n. 3 Pt 2, p. 767-71, Sep 1997.

DE ANGELIS LOBO D'AVILA, K., *et al.* Exercise reverses peripheral insulin resistance in trained L-NAME-hypertensive rats. **Hypertension**, v.34, n.4 Pt 2, p.768-72. Oct, 1999.

DE ANGELIS, K. L. *et al*. Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. Braz J Med Biol Res, v. 33, n. 6, p. 635-41, Jun 2000.

DE ANGELIS, K. *et al*. Improvement of circulation control in trained diabetic rats: role of baroreflex sensitivity and blood flow distribution. Hypertension, v. v. 40, p. p.407, 2002.

DE ANGELIS, K. *et al*. Diabetes and cardiovascular autonomic dysfunction: Application of animal models. Auton Neurosci. 2009 January 28; 145(1-2): 3-10.

DOBRZYNSKI, E.; MONTANARI, D.; AGATA, J.; CHAO, J.; CHAO, L.; Adrenomedullin improves cardiac function and prevents renal damage in streptozotocin-induced rats. *Am J Physiol Endocrin Metab*. 2002; 283 (6): E1291-8.

EWING, D. J.; CAMPBELL, I. W.; CLARKE, B. F. The natural history of diabetic autonomic neuropathy. *Q J Med*. 1980; 49: 95-108.

FARAH, V.; ELASED, K. M.; MORRIS, M. Genetic and dietary interactions: role of angiotensin AT1a receptors in response to a high-fructose diet. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v. 293, n. 2, p. H1083-9, Aug 2007.

FAZAN, R.; IRIGOYEN, M. C.; MORAES, M. F. D.; MAEDA, C. Y.; SALGADO, H. C. Baroreceptor function in short-term streptozotocin diabetic rats. *Hypertension*. 1995; 25: 1398.

FAZAN, R. JR.; BALLEJO, G.; SALGADO, M. C.; MORAES, M. F.; SALGADO, H. C. Hart rate variability and baroreceptor function in chronic diabetic rats. *Hypertension*. 1997; 30(3 Pt 2): 632-5.

FAZAN, R. JR.; DIAS DA SILVA, V. J.; BALLEJO, G.; SALGADO, H. C. Power spectra of arterial pressure and heart rate in streptozotocin-induced diabetes in rats. Hypertens. 1999;17 (4): 489-95.

FEIN, F. S.; KORNSTEIN, L. B.; STROBECK, J. E.; CAPASSO, J. M.; SONNENBLICK, E. H.; Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circulation research*; 47: 992-933.

FLUES, K., *et al.* Exercise training associated with estrogen therapy induced cardiovascular benefits after ovarian hormones deprivation. **Maturitas**, v.65, n.3, p.267-71. Mar, 2010.

GENCOGLU H, TUZCU M, HAYIRLI A, SAHIN K. Protective effects of resveratrol against streptozotocin-induced diabetes in rats by modulation of visfatin/sirtuin-1 pathway and glucose transporters. Int J Food Sci Nutr. 2015;66(3):314–20.

GOTTSÄTER, A.; AHLGREN, A. R.; TAIMOUR, S.; SUNDKVIST, G.; Decreased heart rate variability may predict the progression of carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. *Clin Auton Re.* 2006; 16(3):228-34.

GUZZETTI, S.; COGLIATI, C.; TURIEL, M.; CREMA, C.; LOMBARDI, F.; MALLIANI, A. Sympathetic predominance followed by functional denervation in the progression of chronic heart failure. *Eur Heart J*. 1995; 16(8):1100-7.

GUZZETTI, S.; SPYROU, N.; ROSEN, S. D.; MEZZETTI, S.; MARTINOLI, E.; FOALE, R. A.; CAMIC, P. G.; Low frequency spectral component of heart rate variability and myocardial beta-adrenoreceptor density after acute myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2002; 97(1): 97-104.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION – Managing older people with type 2, 2013. Diabetes Global Guideline.

IRIGOYEN, M. C., *et al.* Changes of renal sympathetic activity in acute and chronic conscious sinoaortic denervated rats. **Hypertension**, v.26, n.6 Pt 2, p.1111-6. Dec, 1995.

IRIGOYEN, M. et al. Fisiopatologia Da Hipertensão: O Que Avançamos? . Revista da Sociedade de Cardioloia do Estado De São Paulo, v. v.1, p. p.20-45, 2003.

IRIGOYEN, M. C. *et al*., Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular. Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Ano XIII nº03, Set, p 1-7, 2004.

IRIGOYEN, M. C., *et al.* Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. **Hypertension**, v.46, n.4, p.998-1003. Oct, 2005.

HARTHMANN, A. D.; DE ANGELIS, K.; COSTA, L. P.; SENADOR, D.; SCHAAN, B. D.; KRIEGER, E. M.; IRIGOYEN, M. C. Exercise training improves arterial baro and chemoreflex in control and diabetic rats. Auton Neurosci. 2007 May 30; 133(2): 115-20.

ITOH N, OHTA H. Pathophysiological roles of FGF signaling in the heart. Front Physiol. 2013;4:247.

JALIL, J. E., *et al.* Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. **Circ Res**, v.64, n.6, p.1041-50. Jun, 1989.

JOAQUIM, L. F. et al. Variabilidade da pressão arterial e frequência cardíaca, e sensibilidade do barorreflexo, em animais geneticamente manipulados. Revista Bras Hipertens, v. 12, p. 36-40, 2005.

JUNOD, A., *et al.* Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **J Clin Invest**, v.48, n.11, p.2129-39. Nov, 1969.

KARDAMI E, JIANG ZS, JIMENEZ SK, HIRST CJ, SHEIKH F, ZAHRADKA P, ET AL. Fibroblast growth factor 2 isoforms and cardiac hypertrophy. Cardiovasc Res. 2004;63(3):458–66.

KARPEN CW, SPANHEIMER RG, RANDOLPH AL, LOWE WL JR. Tissue-specific regulation of basic fibroblast growth factor mRNA levels by diabetes. **Diabetes**. 1992;41(2):222–6.

KHAVANDI, K., *et al.* Diabetic cardiomyopathy--a distinct disease? **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v.23, n.3, p.347-60. Jun, 2009.

KILKENNY C, BROWNE WJ, CUTHILL IC, EMERSON M, ALTMAN DG: Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. PLoS Biol 2010, 8(6): e1000412.

LABINSKYY, N., *et al.* Vascular dysfunction in aging: potential effects of resveratrol, an anti-inflammatory phytoestrogen. **Curr Med Chem**, v.13, n.9, p.989-96, 2006.

LAGOUGE, M., *et al.* Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. **Cell**, v.127, n.6, p.1109-22. Dec 15, 2006.

LILES, J. H. & P. A. FLECKNELL. The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the relief of pain in laboratory rodents and rabbits. **Lab Anim**, v.26, n.4, p.241-55. Oct, 1992.

LIN, Y. & Z. SUN. Current views on type 2 diabetes. **J Endocrinol**, v.204, n.1, p.1-11. Jan, 2010.

LOMBARDI, F.; SANDRONE, G.; SPINNLER, M. T.; TORZILLO, D.; LAVEZZARO, G. C.; BRUSCA, A.; MALLIANI, A. Heart rate variability in the early hours of na acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1996 May 15; 77(12): 1037-44.

LUNDE, I. G., *et al*. Syndecans in heart fibrosis. Cell Tissue Res, 365:539-552, 2016.

MAEDA, C. Y., *et al.* Autonomic dysfunction in short-term experimental diabetes. **Hypertension**, v.26, n.6 Pt 2, p.1100-4. Dec, 1995.

MANCIA, G., *et al.* [Hemodynamics and pressure variability in isolated systolic hypertension]. **Cardiologia**, v.39, n.12 Suppl 1, p.247-50. Dec, 1994.

MARTIN-TIMON, I., *et al.* Type 2 diabetes and cardiovascular disease: Have all risk factors the same strength? **World J Diabetes**, v.5, n.4, p.444-70. Aug 15, 2014.

MASIELLO, P., *et al.* Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. **Diabetes**, v.47, n.2, p.224-9. Feb, 1998.

MATSUI, Y., et al. Syndecan-4 prevents cardiac rupture and dysfunction after myocardial infarction. Circulation Research. 2011; 108: 1328-1339.

MÉSANGEAU, D.; LAUDE, D.; ELGHOZI, J. L. Early detection of cardiovascular autonomic neuropathy in diabetic pigs using blood pressure and heart rate variability. *Cardiovasc Res*. 2000 Mar; 45(4): 889-99.

NEVES, S. M. P. *et al*., Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP, 2013.

NOVELLI, E. L., *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Lab Anim**, v.41, n.1, p.111-9. Jan, 2007.

OAL, M.; EL BEDOUI, J.; SCHINI-KERTH, V.B. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. The Journal of Nutritional Biochemistry, Lexington, v.16, p 1-8, Jan. 2005.

OKOSHI, K., *et al.* [Diabetic cardiomyopathy]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.51, n.2, p.160-7. Mar, 2007.

OLOKOBA, A. B., *et al.* Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. **Oman Med J**, v.27, n.4, p.269-73. Jul, 2012.

PAGANI, M., *et al.* Spectral analysis of R-R and arterial pressure variabilities to assess sympatho-vagal interaction during mental stress in humans. **J Hypertens Suppl**, v.7, n.6, p.S14-5. Dec, 1989.

PAGANI, M., *et al.* Spectral analysis of heart rate variability in the assessment of autonomic diabetic neuropathy. **J Auton Nerv Syst**, v.23, n.2, p.143-53. Aug, 1988.

PANUTSOPULOS D, ZAFIROPOULOS A, KRAMBOVITIS E, KOCHIADAKIS GE, IGOUMENIDIS NE, SPANDIDOS DA. Peripheral monocytes from diabetic patients with coronary artery disease display increased bFGF and VEGF mRNA expression. **J Transl Med.** 2003;1: 6.

PELLIEUX C, FOLETTI A, PEDUTO G, AUBERT JF, NUSSBERGER J, BEERMANN F, ET AL. Dilated cardiomyopathy and impaired cardiac hypertrophic response to angiotensin II in mice lacking FGF-2. J Clin Invest. 2001;108(12):1843–51.

PENDURTHI, U. R., *et al.* Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells : A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.19, n.2, p.419-26. Feb, 1999.

PERRIMON, N. & M. BERNFIELD. Cellular functions of proteoglycans--an overview. **Semin Cell Dev Biol**, v.12, n.2, p.65-7. Apr, 2001.

PICARD, F., *et al.* Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. **Nature**, v.429, n.6993, p.771-6. Jun 17, 2004.

PIRES, M. D., *et al.* Noninvasive assessment of hemodynamic parameters in experimental stenosis of the ascending aorta. **Artif Organs**, v.27, n.8, p.695-700. Aug, 2003.

PRYDZ, K. & K. T. DALEN. Synthesis and sorting of proteoglycans. **J Cell Sci**, v.113 Pt 2, p.193-205. Jan, 2000.

QIN, F., *et al.* The polyphenols resveratrol and S17834 prevent the structural and functional sequelae of diet-induced metabolic heart disease in mice. **Circulation**, v.125, n.14, p.1757-64, S1-6. Apr 10, 2012.

RAZACK, N. N. & D. K. WHERRETT. Type 1 diabetes: New horizons in prediction and prevention. **Paediatr Child Health**, v.10, n.1, p.35-7. Jan, 2005.

RUOSLAHTI, E. Proteoglycans in cell regulation. **J Biol Chem**, v.264, n.23, p.13369-72. Aug 15, 1989.

RIBEIRO, J. P.; MORAES FILHO, R. S. Variabilidade da frequência cardíaca como instrumento de investigação do sistema nervoso autônomo. Rev Brás Hipertens, v. 12, p. 14-20, 2005.

SALEMI, V. M., *et al.* Reference values from M-mode and Doppler echocardiography for normal Syrian hamsters. **Eur J Echocardiogr**, v.6, n.1, p.41-6. Jan, 2005.

SAUTTER, C. K.; DENARDIN, A.; ALVES, O. C.; MALLMANN, A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, vol. 25 (3), p. 437-442, Sep. 2005.

SCHAAN, B. D.; DALL'AGO, P.; MAEDA, C. Y.; FERLIN, E., FERNANDES, T. G.; SCHMID, H.; IRIGOYEN, M. C. Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Dec; 37(12): 1895-902.

SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; MORABITO, N.; CRISAFULLI, A.; D'ANNA, R.; CORRADO, F.; RUGGERI, P.; CAMPO, G. M.; CALAPAI, G.; CAPUTI, A. P.; SQUADRITO, G. The effect of the phytoestrogen genistein on plasma nitric oxide concentracions, endothelial dependent vasodilation in postmenopausal women. Atherosclerosis, Amsterdam, v.2, p. 339-347. Aug. 2002.

SHRIVER, Z., *et al.* Emerging views of heparan sulfate glycosaminoglycan structure/activity relationships modulating dynamic biological functions. **Trends Cardiovasc Med**, v.12, n.2, p.71-7. Feb, 2002.

SOARES, P. P., *et al.* Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. **Auton Neurosci**, v.113, n.1-2, p.24-31. Jun 30, 2004.

SOUZA, S. B., *et al.* Role of exercise training in cardiovascular autonomic dysfunction and mortality in diabetic ovariectomized rats. **Hypertension**, v.50, n.4, p.786-91. Oct, 2007.

STEF, G., *et al.* Resveratrol inhibits aggregation of platelets from high-risk cardiac patients with aspirin resistance. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.48, n.2, p.1-5. Aug, 2006.

STRUNZ, C. M., *et al.* Changes in cardiac heparan sulfate proteoglycan expression and streptozotocin-induced diastolic dysfunction in rats. **Cardiovasc Diabetol**, v.10, p.35, 2011.

SU HC, HUNG LM, CHEN JK. Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006;290(6):E1339-46

SULAIMAN, M., *et al.* Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.298, n.3, p.H833-43. Mar, 2010.

SZKUDELSKI, T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. Experimental Biology and Medicine 2012; 237:481-490.

Task Force of the European Society of Cardiology and North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Circulation. 1996; 95: 1043-1065.

THEOCHARIS, A. D., *et al.* Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. **FEBS J**, v.277, n.19, p.3904-23. Oct, 2010.

TUMOVA, S., *et al.* Basic fibroblast growth factor does not prevent heparan sulphate proteoglycan catabolism in intact cells, but it alters the distribution of the glycosaminoglycan degradation products. **Biochem J**, v.337 (Pt 3), p.471-81. Feb 1, 1999.

VAN DE WEIJER, T., *et al.* Lipotoxicity in type 2 diabetic cardiomyopathy. **Cardiovasc Res**, v.92, n.1, p.10-8. Oct 1, 2011.

VASKO R, KOZIOLEK M, IKEHATA M, RASTALDI MP, JUNG K, SCHMID H, et al. Role of basic fibroblast growth factor (FGF-2) in diabetic nephropathy and mechanisms of its induction by hyperglycemia in human renal fibroblasts. **Am J Physiol Renal Physiol**. 2009;296(6):F1452–63.

VESSAL, M., *et al.* Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v.135C, n.3, p.357-64. Jul, 2003.

WANG, Z., *et al.* Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. **Int J Mol Med**, v.9, n.1, p.77-9. Jan, 2002.
WU, Y. J., *et al.* The interaction of versican with its binding partners. **Cell Res**, v.15, n.7, p.483-94. Jul, 2005.

YAMAMOTO, M.; YAMASAKI.; KODAMA, M.; MATSUHISA, M.; KISHIMOTO, M.; OZAKI, H.; TANI, A.; UEDA, N.; IWASAKI, M.; HORI, M. Impaired diurnal cardiac autonomic function in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 1999 Des; 22 (12): 2072-7.

YAR, A. S., *et al.* The effects of resveratrol on cyclooxygenase-1 and -2, nuclear factor kappa beta, matrix metalloproteinase-9, and sirtuin 1 mRNA expression in hearts of streptozotocin-induced diabetic rats. **Genet Mol Res**, v.10, n.4, p.2962-75, 2011.