

## **EFEITO DO ANTIOXIDANTE RUTINA EM RATOS DIABÉTICOS: ESTUDO FUNCIONAL *IN VIVO* E *IN VITRO* DO CORAÇÃO.**

Julliano Fernandes Campos Guimarães, Katashi Okoshi, Bruno Paulino Di Muzio, Ana Angélica Henrique Frenandes, Marina Politi Okoshi, Antônio Carlos Cicogna. - inter-áreas - Medicina - Departamento de Clínica médica - Faculdade de Medicina - Campus de Botucatu.

O diabetes mellitus é um distúrbio crônico do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Esta doença consiste na resposta secretória defeituosa ou deficiente de insulina, que se manifesta pela utilização inadequada de glicose pelos tecidos com conseqüente hiperglicemia.<sup>1</sup>

No diabetes mellitus os distúrbios do metabolismo de glicose levam a complicações que envolvem doenças cardiovasculares progressivas severas<sup>2</sup>, incluindo hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e doença arterial coronariana, sendo que 75% dos pacientes diabéticos morrem por algum desses eventos cardiovasculares.<sup>3-5</sup>

Dentre os diversos problemas cardíacos que surgem como decorrência do diabetes, a cardiomiopatia diabética não aterogênica tem sido reconhecida<sup>6</sup> como forma única de doença cardíaca em aproximadamente 30% dos pacientes com diabetes mellitus insulino-dependente, apresentando-se precocemente com anormalidade na função diastólica seguida por disfunção sistólica do ventrículo esquerdo.<sup>7,8</sup> Segundo Codinach-Huix *et al.*<sup>9</sup> o diabetes pode produzir alterações metabólicas, fibrose intersticial, hipertrofia miocárdica, doença microvascular e disfunção autonômica, sendo que todas essas alterações seriam responsáveis pela doença miocárdica. Nesse aspecto a disfunção ventricular tem sido descrita em pacientes diabéticos jovens assintomáticos sem outras doenças que poderiam afetar o músculo cardíaco, sendo nesse caso o diabetes considerado como a única causa da doença miocárdica.<sup>9</sup>

Com o intuito de verificar a relação entre diabetes mellitus e os danos causados por estresse oxidativo, muitos experimentos em ratos com diabetes induzido pela administração de estreptozotocina (STZ) têm sido realizados.<sup>10</sup>

Alguns estudos têm sugerido que os flavonóides, por sua ação antioxidante, podem ser benéficos no diabetes mellitus. Jouad *et al.* observaram queda do nível de glicemia em ratos diabéticos que foram tratados com extrato da planta *Spergularia purpurea*, rica fonte de flavonóides.<sup>11</sup> Em pacientes diabéticos, os flavonóides rutina e quercetina inibem a glicosilação da hemoglobina induzida pela hiperglicemia.<sup>12</sup>

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho é avaliar os efeitos do flavonóide rutina sobre a glicemia, os lípides, a função (*in vivo* e *in vitro*) e a histologia do ventrículo esquerdo e o estresse oxidativo em ratos diabéticos.

### *Protocolo experimental, estudos bioquímico e histológico*

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando em média 300 gramas. Estes foram alojados em gaiolas (2 ou 3 ratos/gaiola), sendo mantidos em ambiente com temperatura (25±2°C) e fotoperíodo (ciclos 12/12 horas claro/escuro) controlados, com água e ração comercial oferecidos *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: C=controle, 15 ratos; R=rutina, 15 ratos; DM=diabético, 15 ratos; DM+R=diabético+rutina, 15 ratos. O período de experimentação foi de 35 dias.

O diabetes mellitus experimental foi induzido através da administração intraperitoneal de estreptozotocina, em dose única, na concentração de 60 mg/kg de peso corporal, diluída em tampão citrato 0,1M pH 4,5. Após 48 horas foram retiradas amostras de sangue pela punção da cauda e a glicemia foi determinada através de glicosímetro (Advantage®). Todos os animais que receberam estreptozotocina apresentaram concentração de glicose acima de 220 mg/dL e foram considerados diabéticos.<sup>13</sup>

Com o estabelecimento do estado diabético os animais pertencentes ao grupo DM+R receberam o flavonóide rutina pela via intraperitoneal na concentração de 50 mg/kg de peso corporal, diluída em propilenoglicol. A administração do antioxidante foi semanal durante todo o período experimental.

Ao final do experimento, após eutanásia dos animais, foram feitas as determinações séricas através de kits reagentes comerciais.

Após a retirada do coração, fragmentos do miocárdio do ventrículo esquerdo foram fixados em formalina tamponada e então processados e incluídos em *paraplast*. Cortes histológicos com 7 µm de espessura foram corados com hematoxilina-eosina para avaliação morfológica.

#### *Estudo ecocardiográfico*

Ao final do período experimental os ratos foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg, i.p.) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg, i.p.). Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo e o exame foi realizado com o equipamento modelo Sonos 2000 da Hewlett-Packard Co., equipado com transdutor eletrônico de 7,5 MHz. Para medir as estruturas cardíacas foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo-M) orientado pelas imagens em modo bidimensional, estando o transdutor em posição paraesternal eixo menor. A avaliação do VE foi realizada posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares.<sup>14</sup> A imagem do átrio esquerdo foi obtida posicionando o cursor do modo-M ao nível do plano da valva aórtica. As imagens obtidas em modo-M foram registradas em impressora modelo UP-890 da Sony Co. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas, manualmente, com o auxílio de um paquímetro de precisão. As seguintes estruturas cardíacas foram medidas: diâmetros diastólico e sistólico do VE (DDVE e DSVE, respectivamente), diâmetro do átrio esquerdo (AE) e espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV) e da parede posterior do VE (EDPP). Os valores de DDVE e AE foram normalizados para o peso corporal. A função sistólica do VE foi avaliada pela porcentagem de encurtamento endocárdico,  $\% \Delta D [(DDVE - DSVE) / DDVE \times 100]$  e a velocidade de encurtamento da parede posterior do VE, VEPP (tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior). A massa do VE (MVE) foi calculada segundo a fórmula:<sup>14</sup>  $[(DDVE + EDSIV + EDPP)^3 - DDVE^3] \times 1,04$ ; no qual o valor 1,04 indica a densidade específica do miocárdio. O índice de MVE (IMVE) foi calculado normalizando a MVE para o peso corporal. Para o estudo da função diastólica do VE, o fluxo transmitral foi obtido na posição ecocardiográfica denominada apical quatro câmaras. Foram medidas as velocidades máximas do fluxo de enchimento inicial (onda E) e do fluxo decorrente da contração atrial (onda A).

#### *Estudo do músculo papilar*

Para o estudo *in vitro* do ventrículo esquerdo o coração foi removido rapidamente e colocado em solução de Krebs-Henseleit, à temperatura de 28°C, previamente oxigenada (10 min) com 95% de oxigênio (O<sub>2</sub>) e 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Após dissecação, o músculo papilar foi isolado e teve suas extremidades presas a dois anéis de aço inoxidável, sendo rapidamente transferidos para a câmara de vidro contendo solução de Krebs-Henseleit com as mesmas características anteriores. Os músculos papilares foram mantidos em posição vertical na câmara de vidro. Os músculos foram estimulados 12 vezes por minuto por meio de eletrodos de platina tipo agulha, acoplados a estimulador elétrico, e os dados foram registrados em um polígrafo através de um transdutor de força. Os músculos papilares foram estudados em contração isométrica. Os índices de contração avaliados foram: tensão desenvolvida máxima (TD); derivada positiva máxima de tensão desenvolvida (+dT/dt); e tempo para atingir o pico de tensão desenvolvida (TPT). O relaxamento muscular foi avaliado por dois índices: intervalo de tempo entre o pico da tensão desenvolvida e o momento correspondente à redução de 50% no valor dessa tensão (TR<sub>50</sub>); e derivada negativa máxima da tensão desenvolvida (-dT/dt).

#### *Análise estatística*

Os resultados são expressos em média ± desvio padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas pela ANOVA, complementada pelo teste de Tukey quando houve diferença entre os grupos. Todas as discussões são realizadas no nível de 5% de significância.

Serão omitidos os dados comparativos do grupo que só recebeu rotina “R”, já que se comportaram de forma semelhante ao controle “C” em todas as variáveis analisadas, mostrando que a rotina não causou alterações em ratos não diabéticos em relação ao que foi estudado.

O peso corporal dos animais dos grupos experimentais não se mostrou diferente no início do experimento. No entanto, ao final do experimento, o grupo DM mostrou valores menores em relação ao C e DM+R. O grupo DM+R apresentou valor intermediário entre os outros grupos (Tabela I).

Na Tabela I também são mostrados as determinações bioquímicas realizadas nesse estudo. Após 48 horas do início do experimento não se observou diferença estatística entre os valores da

glicemia dos grupos DM+R e DM, sendo que ambos foram significativamente superiores aos valores obtidos no grupo controle C. Certificou-se então o estabelecimento do diabetes nos grupos que receberam estreptozotocina. Ao final do experimento, houve diminuição acentuada da glicemia no grupo DM+R, embora ainda elevada quando comparada ao grupo C.

Não houve diferença entre os valores de proteínas totais séricas entre os grupos.

Na análise do perfil lipídico, o grupo DM apresentou valores maiores de triglicérides, colesterol total, LDL-colesterol, VLDL-colesterol e menor valor de HDL-colesterol. Os animais que receberam rotina apresentaram redução dos níveis de triglicérides, colesterol total, LDL-colesterol e aumento no valor de HDL-colesterol. Especificamente em relação aos triglicérides e HDL-colesterol, a rotina causou normalização de seus valores. O nível de VLDL-colesterol não sofreu influência com a rotina.

Na avaliação de estado do estresse oxidativo, observamos elevação dos níveis de lipoperóxido e hidroperóxido no grupo diabético e o efeito benéfico da rotina sobre esses peróxidos chegando a normalizar o valor do hidroperóxido.

Ao estudo *in vivo* do coração (Tabela II), não observamos diferença nos diâmetros diastólico do VE e sistólico do átrio esquerdo entre os grupos. No entanto, quando normalizamos os valores para o peso corporal constatamos valores aumentados no grupo DM e valores intermediários entre os outros dois grupos nos animais que receberam rotina. Quando avaliamos os valores de massa do VE normalizados para o peso corporal (IMVE), observamos valores aumentados no grupo DM e sem diferença significativa entre animais controles e aqueles que receberam rotina. Houve comprometimento da função sistólica do VE nos animais diabéticos, e naqueles que receberam rotina os índices não diferiram dos controles. A função diastólica *in vivo* não foi diferente entre os três grupos.

No estudo *in vitro* do músculo papilar do VE, observamos alterações discretas. Somente um índice de capacidade contrátil (TPT) estava comprometido no grupo diabético, e a rotina melhorou este índice embora não o tenha normalizado. Em relação ao relaxamento miocárdico, o índice TR<sub>50</sub> estava comprometido e a rotina causou melhora que não atingiu significância estatística (Tabela III). A análise morfológica da musculatura cardíaca mostrou cardiomiócitos com aspecto normal em todos os grupos estudados: as células apresentaram aspecto arredondado ou polimórfico, sarcoplasma acidófilo, núcleo basófilo e central. Na matriz extracelular entre os cardiomiócitos, observou-se tecido conjuntivo frouxo com fibroblastos e capilares sanguíneos.

Os resultados obtidos indicam, portanto, efeito benéfico da rotina sobre a glicemia, os lípides séricos, a função contrátil *in vivo* e *in vitro* do ventrículo esquerdo e sobre a atividade dos radicais livres de oxigênio.

## Referências Bibliográficas

1. Crawford J.M.; Cotran R.S. Pancreas. In: Cotran R.S.; Kumar V.; Collins T. (Eds). **Pathologic Basics of Disease**. 6<sup>th</sup> ed. Translated to portuguese. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 817-32.
2. Price K.D.; Price C.S.C.; Reynolds R.D. Hyperglycemia-induced ascorbic acid deficiency promotes endothelial dysfunction and the development of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, n.158, p.1-12, 2001.
3. Kannel W.B.; Hjortland M.; Castelli W.P. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. **Am. J. Cardiol.**, n.34, p.29-34, 1974.
4. Giugliano D.; Ceriello A.; Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. **Diabetes Care**, n.19, p.257-65, 1996.
5. Gu K.; Cowie C.C.; Harris M.L. Diabetes and decline in heart disease mortality in U.S. adults. **JAMA**, n.281, p.1291-7, 1999.
6. Tesfamariam B. Free radical in diabetic endothelial cell dysfunction. **Free. Radic. Biol. Med.**, n.16, p.383-91, 1994.
7. Thompson K.H.; Godin D.V. Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes. **Nutr. Res.**, n.15, p.1377-410, 1995.
8. Cosentino F.K. et al. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. **Circulation**, n.96, p.25-8, 1997.

9. West I.C. Radicals and oxidative stress in diabetes. **Diabetes Med.**, n.17, p.171-80, 2000.
10. Sies H. Strategies of antioxidant defenses. **Eur. J. Biochem.**, n.215, p.213-9, 1993.
11. Panpargkul S. et al. The effects of diabetes on performance and metabolism in diabetic rats. **Circ. Res.**, n.47, p.911-21, 1980.
12. Clarke J. et al. Effect of vitamin C supplementation on hepatic cytochrome P450 mixed-function oxidase activity in streptozotocin-diabetic rats. **Toxicol. Lett.**, n.89, p.249-56, 1996.
13. Babu P.S.; Srinivasan K. Renal lesions in streptozotocin induced diabetic rats maintained on onion and capsaicin containing diets. **J. Nutr. Biochem.**, n.10, p.477-83, 1999.
14. Litwin S.E. et al. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy: chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. **Circulation**, n.91, p.2642-54, 1995.

Tabela 1 – Determinações bioquímicas séricas de glicose, perfil lipídico, proteínas totais e estresse oxidativo

	C (n=14)	DM (n=16)	DM+R (n=16)
Glicemia 48h (mg/dL)	93,1 ± 3,0	414 ± 77 *	417 ± 78 *
Glicemia 35 dias (mg/dL)	98,9 ± 3,7	398 ± 57*	150 ± 30* <sup>#</sup>
Proteínas totais (mg/dL)	0,22 ± 0,01	0,20 ± 0,01*	0,21 ± 0,02 <sup>#</sup>
Triglicérides (mg/dL)	99,7 ± 5,8	184 ± 9*	108 ± 7 <sup>#</sup>
Colesterol Total (mg/dL)	89,9 ± 6,0	172 ± 5*	106 ± 9* <sup>#</sup>
LDL colesterol (mg/dL)	36,4 ± 5,6	112 ± 14*	53,6 ± 15,0* <sup>#</sup>
HDL colesterol (mg/dL)	35,5 ± 3,5	25,7 ± 4,9*	36,0 ± 6,1 <sup>#</sup>
VLDL colesterol (mg/dL)	53,5 ± 13,8	60,2 ± 11,8*	57,1 ± 12,0*
Lipoperóxido (nmol/mL)	6,15 ± 1,86	17,4 ± 2,3*	9,03 ± 1,77* <sup>#</sup>
Hidroperóxido (nmol/mL)	6,48 ± 1,82	8,40 ± 1,99*	7,12 ± 1,85 <sup>#</sup>

Valores expressos em média ± desvio padrão. C: grupo controle; DM: grupo diabético; DM+R: diabético + rotina; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade. \*: p<0,05 vs. C; #: p<0,05 vs. DM (ANOVA complementada pelo teste de Tukey).

Tabela 2 – Variáveis ecocardiográficas (estudo *in vivo*)

	C (n=14)	DM (n=16)	DM+R (n=16)
PC inicial (g)	365 ± 24	409 ± 34	370 ± 27
PC final (g)	444 ± 42	287 ± 33*	345 ± 62* <sup>#</sup>
FC (bpm)	292 ± 33	271 ± 57	283 ± 30
DDVE (mm)	8,12 ± 0,42	8,30 ± 0,46	8,35 ± 0,51
DSVE (mm)	3,75 ± 0,57	4,26 ± 0,36*	3,97 ± 0,50
EDPP (mm)	1,53 ± 0,11	1,46 ± 0,07*	1,34 ± 0,06* <sup>#</sup>
EDSIV (mm)	1,65 ± 0,05	1,48 ± 0,10*	1,40 ± 0,07* <sup>#</sup>
AE (mm)	5,76 ± 0,64	5,73 ± 0,56	5,36 ± 0,53
DDVE/PC (mm/kg)	18,4 ± 1,81	29,2 ± 3,07*	24,7 ± 3,26* <sup>#</sup>
AE/PC (mm/kg)	13,0 ± 1,59	20,1 ± 2,09*	16,0 ± 2,85* <sup>#</sup>
Massa VE (g)	0,94 ± 0,10	0,89 ± 0,12	0,81 ± 0,11*
IMVE (g/kg)	2,13 ± 0,25	3,12 ± 0,47*	2,38 ± 0,23 <sup>#</sup>
Espessura relativa VE	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,01*	0,16 ± 0,01* <sup>#</sup>
%ΔD	54,1 ± 5,2	48,7 ± 3,4*	52,6 ± 4,2 <sup>#</sup>
VEPP (mm/s)	44,5 ± 4,6	35,5 ± 5,4*	42,7 ± 4,6 <sup>#</sup>
E mitral (cm/s)	74,1 ± 11,7	75,1 ± 14,3	79,8 ± 12,2
A mitral (cm/s)	52,9 ± 11,3	48,1 ± 18,1	63,1 ± 21,8
E/A	1,43 ± 0,23	1,77 ± 0,82	1,36 ± 0,34

Valores expressos em média ± desvio padrão. C: grupo controle; DM: grupo diabético; DM+R: diabético + rotina; PC: peso corporal; FC: frequência cardíaca em batimentos por minuto (bpm); DDVE: diâmetro diastólico do VE; DSVE: diâmetro sistólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; AE: diâmetro do átrio esquerdo; IMVE: índice de massa do VE; %ΔD: porcentagem de encurtamento endocárdico do VE; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE; E: pico de velocidade do fluxo transvalvar mitral na fase de enchimento rápido do VE; A: pico de velocidade do fluxo transvalvar mitral devido à contração atrial; E/A: razão entre as ondas E e A do fluxo transvalvar mitral; \*: p<0,05 vs. C; #: p<0,05 vs. DM (ANOVA complementada pelo teste de Tukey).

Tabela 3 - Variáveis obtidas do estudo do músculo papilar isolado em contração isométrica.

	Controle (n=16)	DM (n=14)	DM+R (n=16)
Área seccional (mm <sup>2</sup> )	0,96 ± 0,19	0,89 ± 0,14	0,99 ± 0,21
TD (g/mm <sup>2</sup> )	5,83 ± 0,86	7,00 ± 0,85	6,49 ± 0,66
+dT/dt (g/mm <sup>2</sup> /s)	59,5 ± 9,5	66,7 ± 7,7	69,1 ± 11,1
TPT (ms)	48 ± 7,5	195 ± 8,1*	168 ± 14,4* <sup>#</sup>
TR <sub>50</sub> (ms)	160 ± 29,6	225 ± 15,3*	213 ± 26,5*
-dT/dt (g/mm <sup>2</sup> /s)	25,5 ± 4,8	23,3 ± 4,3	22,0 ± 3,2

Valores expressos em média ± desvio padrão. DM: grupo de ratos com diabetes mellitus; DM+R: grupo de ratos com diabetes mellitus + rotina; TD: tensão desenvolvida máxima; +dT/dt: derivada positiva máxima da tensão desenvolvida; TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; TR<sub>50</sub>: intervalo de tempo entre o pico da tensão desenvolvida e o momento correspondente à redução de 50% no valor dessa tensão; -dT/dt: derivada negativa máxima da tensão desenvolvida; \*: p<0,05 vs. Controle; #: p<0,05 vs. DM; ANOVA complementada com teste de Tukey.

**Bolsa: CNPq**