

Nívia Maria Santiago

# Efeitos cardíacos produzidos pela ovariectomia em ratas diabéticas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de doutora em fisiologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Doutora Maria José Campagnole-Santos

Belo Horizonte

2013

Dedico essa tese ao Daniel,  
meu grande e eterno amor,  
pelo apoio e incentivo incondicionais,  
essenciais para a realização desse trabalho.  
O seu companheirismo me fortaleceu  
nos momentos mais difíceis e  
tornou as etapas percorridas mais belas

### **LOCAL DE EXECUÇÃO**

Esse trabalho foi desenvolvido no laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, UFMG (Experimentos com ratos Sprague-Dawley) e no laboratório do Prof. Dr. Mark Chappell e Profa. Dra. Jasmina Varagic no “Hypertension and Vascular Research Center” da Wake Forest University, Winston-Salem, Carolina do Norte, EUA (Experimentos com ratos mRen2.Lewis).

### **APOIO FINANCEIRO**

CNPq, CAPES e INCT – nanobiofar

## ÍNDICE

Lista de Abreviaturas .....	viii
Resumo .....	xi
Abstract .....	xiii
1. Introdução	
1.1. Diabetes Mellitus e Doenças Cardiovasculares .....	12
1.2. Cardiomiopatia Diabética .....	13
1.3. Indução de Diabetes Experimental do tipo I .....	16
1.4. Mecanismos envolvidos com o efeito deletério cardíaco induzido pelo diabetes .....	17
1.5. Diabetes e Estrógeno .....	21
1.6. Estrógeno no desenvolvimento de doenças cardíacas .....	23
1.7. Linhagem de ratos mRen2.Lewis .....	28
2. Objetivos	
2.1. Objetivo Geral .....	30
2.2. Objetivos Específicos .....	30
3. Material e Métodos	
3.1.1. Animais .....	32
3.1.2. Ovariectomia .....	32
3.1.3. Indução do diabetes experimental do tipo I .....	33
3.1.4. Medida da Pressão Arterial .....	34
3.1.5. Dosagens Plasmáticas .....	35
3.2. Parte 1: Métodos utilizados exclusivamente com os animais Sprague-Dawley .....	35
3.2.1. Tratamento com Insulina .....	35
3.2.2. Grupos Experimentais .....	36
3.2.3. Evolução do Ciclo Estral .....	36
3.2.4. Ecocardiografia .....	37
3.2.5. Análise da Hipertrofia Ventricular Esquerda .....	38
3.2.6. Análise Histológica .....	38
3.3. Parte 2: Métodos utilizados exclusivamente com os animais mRen2.Lewis .....	39
3.3.1. Grupos experimentais .....	39
3.3.2. Tratamento com o agonista do receptor GPR30, G1 .....	39
3.3.3. Análise Histológica .....	40
3.3.4. Western Blotting .....	40
3.3.5. Determinação dos níveis de Óxido Nítrico (NO) no VE .....	42
3.3.6. Atividade Enzimática .....	42
3.4. Análise Estatística .....	43
4. Discussão .....	44
5. Conclusão .....	54



## LISTA DE ABREVIATURAS

- AGEs - produtos finais de glicação avançada
- Ang - angiotensina
- ANOVA – análise de variância
- AT<sub>1</sub> - receptor de Angiotensina II tipo 1
- AT<sub>2</sub> - receptor de Angiotensina II tipo 2
- ATP – trifosfato de adenosina
- CTL – grupo controle
- DC - débito cardíaco
- DM - diabetes mellitus
- DMSO – dimetil-sulfóxido
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- ECA - enzima conversora de angiotensina
- ECA2: enzima conversora de angiotensina 2
- EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
- EF1- $\alpha$  - *Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1*
- ER - receptor de estrógeno
- ERO - espécies reativas de oxigênio
- ERP - espessura relativa da parede
- FC – frequência cardíaca
- FE - fração de ejeção
- G-1 - agonista do receptor GPR30
- GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GLUT – transportador de glicose
- GPR30 - receptor de estrógeno acoplado à proteína G-30
- HDL - lipoproteína de alta densidade
- HPLC - *high-performance liquid chromatography*
- INS - insulina
- LDL - lipoproteína de baixa densidade
- Mas - receptor da Angiotensina-(1-7)
- mRen – linhagem de ratos congênicos mRen2.Lewis
- NaCl – cloreto de sódio

- NAD – nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NADPH oxidase - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
- NEP - endopeptidase neutral
- NO - óxido nítrico
- NOS - NO sintase
- PARDIA - parede posterior do VE em diástole
- PARSIS - parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole
- PAS - pressão arterial sistólica
- PCP - prolil-carboxipeptidase.
- PEP - prolil-endopeptidase
- SD – linhagem de ratos Sprague-Dawley Hannover
- SERCA - *sarcoplasmatic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*
- SHR – *spontaneous hypertensive rat*
- SRA - sistema renina angiotensina
- STZ - estreptozotocina
- TRIV - tempo de relaxamento isovolumétrico
- VDF - volume diastólico final do ventrículo esquerdo
- VE – ventrículo esquerdo
- VEDIA - diâmetro do ventrículo esquerdo ao final da diástole
- VESIS - diâmetro do ventrículo esquerdo ao final da sístole
- VSF - volume sistólico final do ventrículo esquerdo
- ZnCl<sub>2</sub> – cloreto de zinco

## RESUMO

Neste estudo testamos a hipótese de que a depleção do estrógeno exacerbe o efeito deletério cardíaco induzido pelo diabetes em dois diferentes modelos animais: normotensos - Sprague-Dawley (SD) e hipertensos - mRen2.Lewis (mRen), uma linhagem de ratos transgênicos que apresenta uma maior sensibilidade ao estrógeno.

**Materiais e Método:** O delineamento experimental foi similar para os dois modelos animais: a ovariectomia (OVX) foi realizada nas fêmeas entre 10-11 semanas de idade e após uma semana parte dos animais recebeu uma injeção única de estreptozotocina (STZ) para a indução de diabetes tipo I. Dessa forma, o presente estudo foi dividido em 2 experimentos: Experimento I (resultados obtidos com as ratas SD) e Experimento II (resultados obtidos com as ratas mRen). No Experimento I, parte dos animais diabéticos receberam insulina exógena (INS) para a reversão do quadro de hiperglicemia. As ratas SD foram divididas em 6 grupos experimentais: CTL, STZ, OVX, OVX-STZ, STZ + INS, OVX-STZ + INS. No Experimento II, as ratas mRen foram divididas em 4 grupos experimentais: mRen CTL; mRen STZ; mRen OVX e mRen OVX-STZ. Além disso, a participação do novo receptor de estrógeno, GPR30, foi avaliada nas fêmeas mRen2.Lewis OVX-STZ através do uso de seu agonista específico, o G1. Para isso, as ratas foram divididas em 3 grupos experimentais: CTL, OVX-STZ + veículo e OVX-STZ + G1. **Resultados: Experimento I** - As fêmeas STZ apresentaram um prejuízo na função sistólica (redução na fração de ejeção e de encurtamento), aumento no tempo de ejeção, redução da ERP e aumento da fibrose cardíaca. A depleção de estrógeno não modificou os efeitos deletérios do diabetes sobre a função e estrutura cardíaca nas ratas OVX-STZ. Além disso, a reposição de insulina restaurou as alterações cardíacas observadas nas ratas que apresentavam a concomitante depleção de estrógeno e diabetes (OVX-STZ + INS), sugerindo que o efeito pronunciado do diabetes sobre a função e estrutura cardíaca mascara os possíveis efeitos induzidos pela ovariectomia; **Experimento II:** As fêmeas mRen OVX-

STZ apresentaram um aumento nos níveis de pressão arterial, na deposição de colágeno no tecido cardíaco e no diâmetro do cardiomiócito quando comparadas às ratas que foram submetidas à ovariectomia e indução de diabetes isoladamente. Essas alterações foram acompanhadas de uma maior expressão cardíaca do receptor  $AT_1$  e de uma redução na expressão de eNOS que foi associada a menores níveis de NO. Esses efeitos foram também observados nas ratas mRen STZ, porém apenas as ratas mRen OVX-STZ tiveram um aumento da razão da expressão dos receptores  $AT_1$ / Mas, aumento da quantidade de Ang II remanescente no VE e da expressão cardíaca da Nox2. Dessa forma, nosso estudo sugere que as alterações fenotípicas observadas nas ratas mRen OVX-STZ são decorrentes de um efeito adicional da depleção de estrógeno e diabetes sobre o SRA e produção de espécies reativas de oxigênio. O tratamento das ratas mRen OVX-STZ com o agonista do receptor GPR30 (G1) preveniu o efeito do diabetes sobre a produção de colágeno e reduziu o grau de hipertensão arterial. Além disso, a ativação do receptor GPR30 foi capaz de reverter a redução da expressão cardíaca da eNOS, sem alterar o efeito do diabetes sobre a ativação do SRA cardíaco. **Conclusão:** nossos resultados mostram que a ativação seletiva do novo receptor de estrógeno GPR30 nas ratas mRen<sup>2</sup>.Lewis previne os efeitos deletérios cardíacos observados com a concomitante ausência de estrógeno e insulina através da redução da pressão arterial e preservação da via da eNOS.

## ABSTRACT

The present study evaluated the hypothesis that estrogen depletion may exacerbate the cardiac deleterious effect induced by diabetes in two different animal models: Sprague-Dawley (SD) and mRen2.Lewis (mRen), a strain that exhibits greater estrogen sensitivity. **Material and Methods:** The experimental design was similar for both animal models: ovariectomy (OVX) was performed between 10-11 weeks of age and diabetes subsequently induced one week later with a single dose of streptozotocin (STZ; 65 mg/kg) for 4 weeks. Our study was divided into two experiments: Experiment I (results obtained with SD rats) and Experiment II (results obtained with mRen rats). In Experiment I, part of diabetic animals received exogenous insulin (INS) in order to restore the hyperglycemic effects. SD rats were divided into 6 groups: CTL, STZ, OVX, OVX-STZ, STZ + INS, OVX-STZ + INS. In Experiment II, rats were divided into 4 groups: mRen CTL; mRen STZ; mRen OVX and mRen OVX-STZ. The potential beneficial cardiovascular effects of G-1, a selective agonist of a novel estrogen receptor GPR30, was evaluated in insulin and estrogen depleted mRen.Lewis rats. Hemizygous littermates were divided into 3 groups: CTL, OVX-STZ + vehicle and OVX-STZ + G1. **Results:** Experiment I - STZ rats showed an impaired systolic function (reduced ejection fraction and fractional shortening), increased ejection time, reduced relative wall thickness and increased cardiac fibrosis. Depletion of estrogen did not change the diabetic deleterious effects on cardiac structure and function in OVX-STZ rats. Moreover, insulin replacement restored cardiac changes observed in rats that had concomitant diabetes and estrogen depletion (OVX + STZ-INS), suggesting that diabetes has a predominant effect on cardiac structure and function than ovariectomy; Experiment II: mRen OVX-STZ rats showed increased blood pressure levels, collagen deposition in the heart tissue and cardiomyocyte diameter when compared to rats that underwent ovariectomy or induction of diabetes alone. These changes were accompanied by an increased cardiac expression of AT<sub>1</sub> receptor and a reduced

cardiac expression of eNOS associated with lower NO levels in the heart. These effects were also observed in mRen STZ rats however only mRen OVX-STZ rats had increased AT<sub>1</sub> to Mas receptor ratio, increased amount of Ang II remained in the left ventricle and increase in cardiac Nox2 expression. Thus, our study suggests that the phenotypic changes observed in OVX –STZ rats are due to an additional effect of estrogen depletion and diabetes on the RAS and reactive oxygen species generation. Chronic treatment with G-1 slightly decreased elevated blood pressure and incidence of microinfarcts in diabetic ovariectomized mRen rats. Furthermore, cardiac expression of eNOS protein increased in G-1 treated rats. In contrast, G-1 did not affect cardiac AT<sub>1</sub> receptor expression. **Conclusion:** the present study suggests that selective activation of a novel GPR30 receptor may prevent cardiac injury in estrogen and insulin depleted mRen2.Lewis rats by reducing blood pressure and preserving eNOS pathway.

# 1. Introdução

## 1.1. Diabetes Mellitus e Doenças Cardiovasculares

Diabetes mellitus (DM) é um conjunto de alterações metabólicas caracterizado por alteração na secreção e/ou função da insulina. As complicações do diabetes estão comumente associadas à utilização inadequada de glicose pelos tecidos com conseqüente hiperglicemia. Nesta doença, as alterações decorrentes do prejuízo do metabolismo da glicose, bem como de outros substratos energéticos, têm como conseqüência o desenvolvimento de complicações vasculares (que podem envolver pequenos e grandes vasos) e neurológicas (Nathan *et al.*, 1993; O'Rahilly *et al.*, 1997).

Classicamente, o diabetes pode ser dividido em 4 subclasses, incluindo: (1) tipo I – causado pela destruição das células beta pancreáticas; (2) tipo II – caracterizado por resistência à insulina; (3) – outros tipos de diabetes (associados com síndromes ou condições clínicas pré-identificadas) e (4) diabetes mellitus gestacional (Maraschin, *et al.*, 2010). No diabetes tipo I, foco desse estudo, os pacientes possuem pouca ou nenhuma capacidade de secreção de insulina e dependem de insulina exógena para prevenção de cetoacidose, coma e morte. O diabetes tipo 1 era anteriormente denominado de diabetes juvenil ou diabetes-insulino dependente. Essa forma de diabetes representa 5 a 10% dos casos de diabetes em geral (Association Diabetes Association *et al.*, 2011). A associação do diabetes tipo I com genes específicos de resposta imune em conjunto com a presença de anticorpos nas ilhotas pancreáticas indicam que a destruição das células betas pancreáticas

observadas nessa condição seja mediada por um processo auto-imune (Dahlquist *et al.*, 1993).

O prognóstico associado ao diabetes tipo I apresentou uma melhora considerável nas últimas décadas, no entanto, pacientes com diabetes tipo I ainda apresentam um alto risco de morrerem prematuramente por algum evento cardiovascular (Soedamah-Muthu *et al.*, 2006). Os distúrbios do metabolismo da glicose podem causar complicações que envolvem doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão arterial sistêmica, doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca. Existem evidências de que pacientes diabéticos sofrem também de uma forma de doença miocárdica não relacionada à doença arterial coronariana ou à hipertensão arterial sistêmica, sendo denominada miocardiopatia diabética ou cardiomiopatia diabética (Kannel *et al.*, 1974; Poornima *et al.*, 2006). Dentre os diversos problemas cardíacos que surgem em decorrência do DM, a cardiomiopatia diabética tem sido reconhecida como uma doença cardíaca específica, que ocorre em aproximadamente 30% dos pacientes diabéticos tipo I (Poornima *et al.*, 2006; Parikh *et al.*, 2006; Okoshi *et al.*, 2007).

## **1.2. Cardiomiopatia Diabética**

A cardiomiopatia diabética é caracterizada por disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo (VE) independente da presença de doença arterial coronariana e/ ou hipertensão arterial (Akula *et al.*, 2003; Neomoto *et al.*, 2006; Murarka *et al.*, 2010). O prejuízo da função diastólica é a alteração funcional observada mais precocemente, caracterizada por anormalidades nas

fases ativa e passiva da diástole, que contribuem com um prolongado tempo de relaxamento e prejuízo da complacência cardíaca (Taegtmeyer *et al.*, 2002; Poornima *et al.*, 2006).

A disfunção diastólica observada na condição de diabetes pode ser uma consequência de um prejuízo da função da maquinaria de cálcio na fase precoce do relaxamento, como por exemplo, um mal funcionamento da SERCA (*sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) e fosfolamban. Além disso, o diabetes pode induzir alterações nas propriedades visco-elásticas do miocárdio, uma consequência do acúmulo de proteínas da matriz citoplasmática, o que contribui com um prejuízo do enchimento ventricular na fase passiva da diástole (Dhalla *et al.*, 1998; Connelly *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2008; Murarka *et al.*, 2010 and Movahed *et al.*, 2010). Ainda em relação à estrutura miocárdica, o aumento na formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) associado à formação de ligações irreversíveis com várias macromoléculas, como por exemplo o colágeno, pode ser considerado um outro mecanismo envolvido com a redução da complacência cardíaca observada nos corações diabéticos. A maior produção de AGEs é uma das consequências da toxicidade celular causada pela hiperglicemia (Cooper *et al.*, 2004; Poornima *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2009).

A alteração no uso de substrato energético pode estar relacionada à disfunção sistólica observada em pacientes diabéticos. Em condições fisiológicas, os ácidos graxos livres são os substratos preferidos pelas células cardíacas e correspondem a cerca de 70% do ATP gerado aerobicamente pelo coração. A alteração predominante que ocorre no metabolismo cardíaco no diabetes é a supressão da utilização da glicose e a utilização excessiva de

ácidos graxos (Ding *et al.*, 2006; Poornima *et al.*, 2006). Essa alteração pode alterar diretamente a contratilidade miocárdica por influenciar a duração do potencial de ação e alterar o trânsito intracelular de cálcio intracelular (Liu *et al.*, 2001). Além disso, o acúmulo de ácidos graxos livres no interior do miócito pode induzir lipotoxicidade e contribuir diretamente para a morte celular por apoptose, o que também contribui com o prejuízo da contratilidade ventricular (Zhang *et al.*, 2001) .

Assim, a cardiomiopatia diabética é vista como resultado de complexas relações entre anormalidades metabólicas que acompanham o diabetes e suas conseqüências celulares, levando à alteração da estrutura e função miocárdica (Fiordaliso *et al.*, 2000; Frustaci *et al.*, 2000). Embora o termo cardiomiopatia diabética tem sido cada vez mais reconhecido na literatura, os mecanismos envolvidos com essa patologia ainda não estão bem elucidados na literatura. O conhecimento nessa área tem-se ampliado com o uso de modelos animais de diabetes experimental em roedores que mimetizam os mecanismos fisiopatológicos comumente observados nos corações diabéticos (Bugger & Abel, 2009). Muitas das alterações cardíacas fenotípicas observadas nos modelos de diabetes tipo I e tipo II em roedores se sobrepõem, de forma que ambos modelos de diabetes são caracterizados pelo aumento da utilização de ácidos graxos livres, redução da utilização de glicose, alteração no remodelamento cardíaco, prejuízo da dinâmica da maquinaria de cálcio e da função mitocondrial (Fiordaliso *et al.*, 2000; 2000; Ren *et al.*, 2000; Pathak *et al.*, 2001). Dessa forma, os modelos de diabetes tipo I e II têm sido utilizados indistintamente para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos da cardiomiopatia diabética.

### 1.3. Indução de Diabetes Experimental do tipo I

O modelo de diabetes tipo I induzido pela injeção de estreptozotocina tem sido amplamente utilizado em laboratório para o estudo do diabetes experimental. A estreptozotocina é uma glicosamina-nitrosureia com ação antimicrobiana e estrutura similar à glicose. Essa droga é captada seletivamente pelas células beta pancreáticas que contêm transportadores de glicose GLUT 2 (Schnedl *et al.*, 1994; Fjallskog *et al.*, 2008). A citotoxicidade produzida pela estreptozotocina ocorre pela alcalinização do DNA celular e subsequente ativação da poli-ADP ribose sintetase causando depleção rápida e letal de NAD nas células pancreáticas, com subsequente redução no nível de ATP e morte celular. Essas alterações levam à inibição da síntese e secreção da insulina pelas células beta-pancreáticas com consequente hiperglicemia e manifestações das complicações comumente observadas no diabetes tipo I (Bennett & Pegg, 1981; Bolzan & Bianchi, 2002).

A maioria dos estudos realizados com o modelo de diabetes induzido pela estreptozotocina reportam prejuízo na função ventricular sistólica e diastólica, com a severidade da disfunção aumentada de acordo com a duração do diabetes (Kajstura *et al.*, 2001; Lacombe *et al.*, 2007; Suarez *et al.*, 2008). Outros estudos mostram um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), alterações na função e expressão de proteínas envolvidas com a maquinaria de cálcio em cardiomiócitos e aumento de tecido conectivo

nos corações de ratos que se tornaram diabéticos através desse modelo (Zhao *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2008).

#### **1.4. Mecanismos envolvidos com o efeito deletério cardíaco induzido pelo diabetes**

O sistema renina angiotensina (SRA) apresenta um papel importante sobre o desenvolvimento das anormalidades cardíacas funcionais e estruturais decorrentes das complicações do diabetes (Fiordaliso *et al.*, 2000; Frustaci *et al.*, 2000; Kajstura *et al.*, 2000). Este sistema é bem conhecido por seu papel no controle da pressão arterial e na homeostase dos fluidos e eletrólitos corporais (Peach *et al.*, 1977). Nas últimas décadas, o SRA passou por importantes alterações conceituais devido à identificação de novos componentes, como por exemplo, a Angiotenina-(1-7). Esse heptapeptídeo pode ser considerado um mediador do SRA particularmente interessante, principalmente por desencadear ações antagônicas àquelas atribuídas ao principal peptídeo efetor desse sistema, a Ang II (Santos *et al.*, 2000; Ferrario *et al.*, 2005). Além da Ang-(1-7), a descoberta da enzima homóloga à enzima conversora de angiotenina (ECA), a ECA2, evidenciou uma importante via metabólica responsável pela síntese de Ang-(1-7) a partir da hidrólise da Ang II (Donoghue *et al.*, 2000; Tipnis *et al.*, 2000). A identificação do receptor Mas como um receptor funcional da Ang-(1-7) completa a formação de um novo eixo dentro do SRA: ECA2/ Ang-(1-7)/ Mas (Santos *et al.*, 2003). Esse eixo representa uma via endógena contra-regulatória possuindo ações opostas às

do braço vasoconstrictor/ proliferativo do SRA, o eixo clássico ACE/ Ang II/ AT<sub>1</sub> (Santos *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2012).

Estudos recentes mostraram de forma consistente que o bloqueio farmacológico do SRA reduz as complicações cardíacas decorrentes do diabetes em humanos e em modelos de diabetes experimental (Arozal *et al.*, 2009; Ruggenti *et al.*, 2010; Malfitano *et al.*, 2012). A hiperglicemia estimula a produção cardíaca de Ang II através da ativação de diferentes componentes do SRA, como por exemplo, angiotensinogênio e receptor AT<sub>1</sub> (Fiordaliso *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Fiordaliso *et al.*, 2001). A produção anormal de Ang II está associada com a morte de cardiomiócitos por apoptose em modelos de diabetes em animais e humanos, sendo ainda frequentemente acompanhada de hipertrofia reativa das células cardíacas remanescentes (Frustaci *et al.*, 2000; Kajstura *et al.*, 2000; Ozdemir *et al.*, 2009). Trabalhos recentes mostram que a manipulação genética e farmacológica da ECA2 pode ser uma estratégia importante no tratamento do diabetes (Bindom *et al.*, 2010; Murca *et al.*, 2012). Apesar de poucos estudos abordarem o papel da ECA2 na cardiomiopatia diabética, a influência do diabetes sobre sua atividade e/ ou expressão dessa enzima sugere que a ECA2 desempenhe um papel no desenvolvimento e progressão das injúrias cardíacas associadas ao diabetes (Landau *et al.*, 2008; Murca *et al.*, 2012; Yamaleyeva *et al.*, 2012).

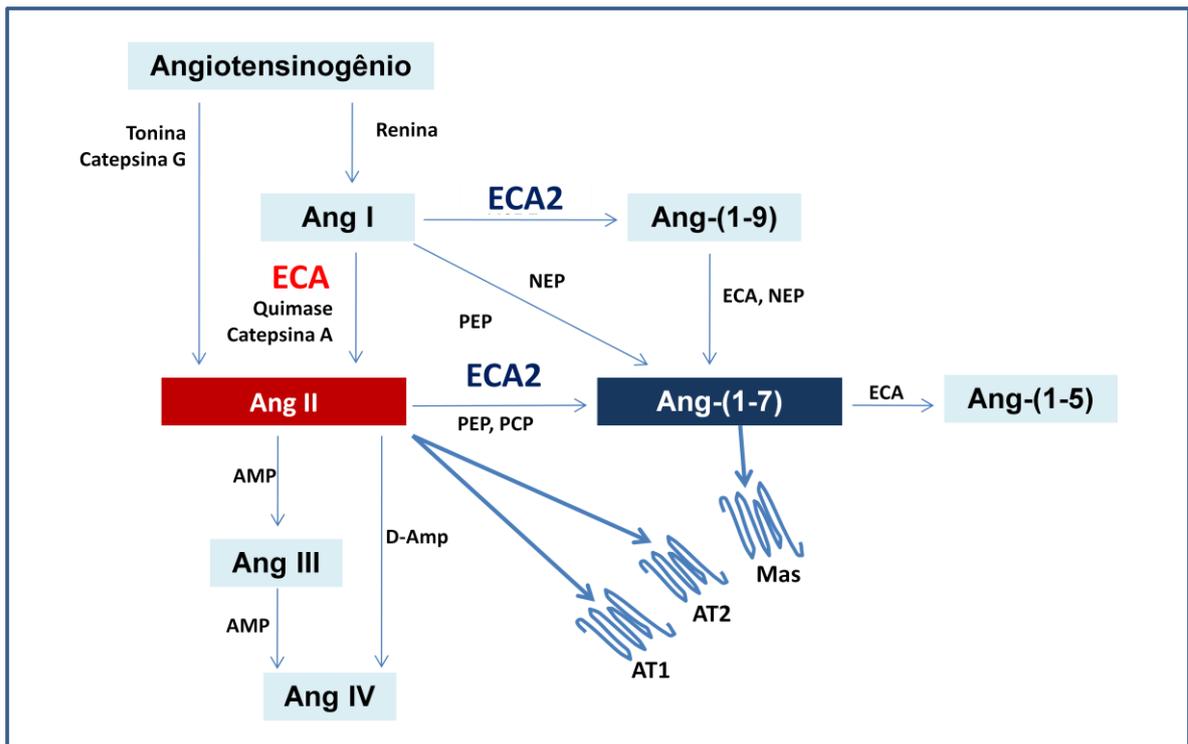


Figura 1: Representação esquemática das principais vias de formação dos peptídeos do SRA e interações da Ang II e Ang-(1-7) com seus receptores. AT<sub>1</sub>: receptor de Angiotensina II tipo 1; AT<sub>2</sub>: receptor de Angiotensina II tipo 2; Mas: receptor da Angiotensina-(1-7); ECA: enzima conversora de angiotensina; ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; PEP: prolil-endopeptidase; NEP: endopeptidase neutral; PCP: prolil-carboxipeptidase. *Fonte: Santos & Ferreira, 2007 (Modificado).*

Um mecanismo patogênico comum envolvido com as diversas complicações decorrentes do diabetes é o aumento do estresse oxidativo resultante de um desequilíbrio entre a geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO). A auto-oxidação da glicose, o aumento da produção de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e a ativação da NADPH oxidase são fatores envolvidos com o aumento do estresse oxidativo observado na condição de diabetes (Inoguchi *et al.*, 2000; Beckman *et al.*, 2001; Singal *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2002). As oxidases da família da NADPH são as principais fontes de ERO nas células cardiovasculares e a subunidade Nox2 é uma das principais responsáveis pela sua ativação enzimática (Griendling *et al.*, 2000; Bendall *et al.*, 2002). Camundongos diabéticos com deleção genética para a Nox2 apresentam uma redução da produção de ERO, além de uma atenuação da severidade da hiperglicemia e perda das células  $\beta$  pancreáticas induzidas pela injeção de estreptozotocina (Xiang *et al.*, 2010). Alguns estudos sugerem a participação da Ang II sobre a formação de ERO nas células cardíacas. A ativação do receptor de Ang II (AT<sub>1</sub>) pode induzir um aumento da atividade da enzima NADPH oxidase e uma maior produção de ERO, enquanto o bloqueio desse receptor é capaz de prevenir o aumento de estresse oxidativo cardíaco em ratos diabéticos (Bendall *et al.*, 2002; Modesti *et al.*, 2005; Ozdemir *et al.*, 2009).

Além dos mecanismos citados acima, alterações na via de formação de óxido nítrico (NO) podem estar envolvidas com o prejuízo da função cardíaca e disfunção endotelial observadas na condição de diabetes (Pieper *et al.*, 1998;

Felaco *et al.*, 2001). O NO é sintetizado a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina, uma reação catalisada pela NO sintase (NOS). Existem três isoformas de NOS já identificadas no miocárdio: NOS neuronal (nNOS ou NOS1) e NOS endotelial (eNOS ou NOS3), constitutivamente expressas em cardiomiócitos e a NOS induzível (iNOS ou NOS2), expressa apenas durante respostas inflamatórias (Barouch *et al.*, 2002; Rhoden *et al.*, 2002; Ziolo & Bers, 2003; Dias-Peixoto *et al.*, 2008; Ziolo *et al.*, 2008). O NO possui importantes efeitos cardiovasculares e pode modular a função cardíaca através de sua influência sobre as correntes de cálcio em cardiomiócitos (Mohan *et al.*, 1995; Balligand & Cannon, 1997). Alguns estudos mostram que o diabetes induz alterações na maquinaria de cálcio e prejudica a produção de NO pelas células endoteliais dos vasos coronarianos através de diferentes mecanismos, como por exemplo, redução da disponibilidade de cofatores e da atividade da eNOS (Meininger *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2008). Além disso, a biodisponibilidade de NO pode estar reduzida no diabetes em decorrência da reação entre NO e ânions superóxidos, uma consequência da maior produção de ERO observada nessa condição (Kojda & Harrison, 1999; Zou *et al.*, 2004).

### **1.5. Diabetes e Estrógeno**

Atualmente está cada vez mais evidente que os hormônios sexuais apresentam um papel importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, o que justifica a importância em se estudar o impacto da diferença entre os gêneros sobre o sistema cardiovascular (Wenger *et al.*, 1993; Brosnihan *et al.*, 1999; Deschepper & Llamas 2007). Mulheres na pré-menopausa apresentam uma menor prevalência e severidade de doenças

cardiovasculares quando comparadas a homens de mesma idade, no entanto, essa diferença entre os sexos desaparece após o início da menopausa (Brosnihan *et al.*, 1999; Chappell *et al.*, 2008). De fato, a doença cardiovascular é a principal causa de morte entre as mulheres na pós-menopausa e atinge quase 50% do total de mortes entre as mulheres (Mosca *et al.*, 1997; Gorodeski *et al.*, 2002), o que sugere uma possível ação cardioprotetora dos hormônios sexuais femininos na manutenção da homeostase do sistema cardiovascular feminino (Marcus *et al.*, 1994; Chappell *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008).

Embora existam evidências de que as doenças cardiovasculares são menos frequentes em mulheres, o efeito do diabetes sobre a função cardiovascular parece ser pior em mulheres quando comparadas a homens de mesma idade (Barret-Connor *et al.*, 1981; Miyazaki-Akita *et al.*, 2007). Estudos epidemiológicos mostram uma forte predisposição para o desenvolvimento de doenças coronarianas em pacientes diabéticos, no entanto, o risco é maior nas mulheres em relação aos homens (Barrett-Connor *et al.*, 1983; Barrett-Connor *et al.*, 1991). O diabetes, quando desenvolvido na mulher, é frequentemente associado com infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e morte (Sowers *et al.*, 1998; Solimene *et al.*, 2010). Outros estudos sugerem que o diabetes é uma patologia que remove as diferenças entre os gêneros no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e que a existência de diabetes em mulheres na pré-menopausa parece mascarar os efeitos cardioprotetores do estrógeno endógeno (Hanes *et al.*, 1996; Sowers *et al.*, 1998; Maric *et al.*, 2009). Por outro lado, estudos clínicos randomizados mostram que mulheres na pós-menopausa em terapia de reposição hormonal (TRH) apresentam um menor

risco de desenvolverem diabetes (Kanaya *et al.*, 2003; Margolis *et al.*, 2004), o que sugere a participação dos hormônios sexuais na fisiopatologia do diabetes.

### **1.6. Estrógeno no desenvolvimento de doenças cardíacas**

Existem vários estudos na literatura que mostram o efeito regulatório do estrógeno sobre o sistema cardiovascular e o papel desse hormônio na prevenção de doenças cardíacas. Os efeitos do estrógeno sobre o perfil do metabolismo de lipídios (redução dos níveis plasmáticos de LDL e aumento dos níveis de HDL) e de carboidratos, função do endotélio vascular e pressão arterial são alguns dos mecanismos envolvidos com os efeitos benéficos desse hormônio sobre o sistema cardiovascular (Mendelsohn & Karas, 1999; Mendelsohn & Karas 2005; Harman *et al.*, 2006; White *et al.*, 2010). Além disso, o estrógeno aumenta a biodisponibilidade de NO, estimula a ativação da eNOS e possui ações anti-oxidante, anti-plaquetária e anti-inflamatória (Brosnihan *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999; Luczak and Leinwand, 2009).

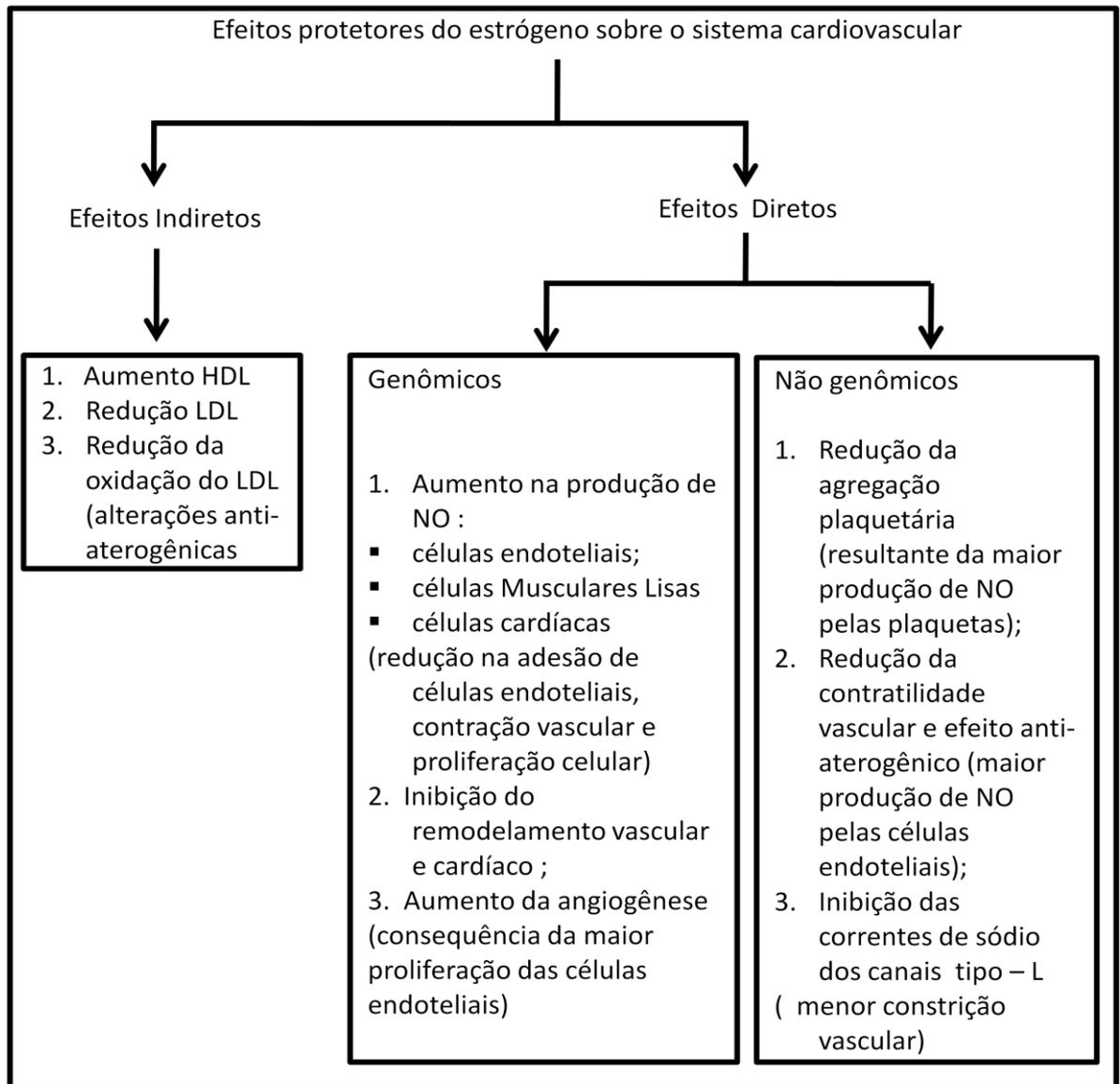


Figura 2: Efeitos protetores do estrógeno sobre o sistema cardiovascular. HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; NO: óxido nítrico. *Fonte: Sowers et al., 1998 (Modificado)*

A descoberta da expressão de receptores de estrógeno e progesterona em cardiomiócitos é um forte indicador do efeito direto dos hormônios sexuais sobre a função do miocárdio (Ingegno *et al.*, 1988; Grohe *et al.*, 1997). Estudos clínicos mostram o efeito cardioprotetor do estrógeno influenciando o desempenho cardíaco e o surgimento de doenças coronarianas (Pines *et al.*, 1993; Schierbeck *et al.*, 2012). Efeitos similares podem ser observados em estudos animais, nos quais a depleção de estrógeno via ovariectomia remove a cardioproteção observada em ratas quando submetidas à isquemia/ reperfusão e sobrecarga de volume (Brower *et al.*, 2003; Gabel *et al.*, 2005; Savergnini *et al.*, 2012). Em contrapartida, a proteção cardíaca pode ser restaurada através da administração do estrógeno exógeno em animais submetidos à sobrecarga de pressão ou ao modelo de hipertensão Doca-Sal (Van Eickels *et al.*, 2001; Shenoy *et al.*, 2009). O efeito modulador do estrógeno sobre os componentes do SRA parece estar envolvido com essas respostas, uma vez que o estrógeno remove o efeito proliferativo da Ang II em culturas de fibroblastos cardíacos e modifica o balanço das enzimas ECA/ ECA2 no coração (Stewart *et al.*, 2006; Shenoy *et al.*, 2009) .

Os efeitos do estrógeno no sistema cardiovascular são mediados através da ativação de seus receptores nucleares clássicos, os subtipos ER (receptor de estrógeno) -  $\alpha$  e ER-  $\beta$ , os quais a ligação com estrógeno promove a translocação do receptor para o núcleo para produzir as ações genômicas desse hormônio (Babiker *et al.*, 2002; Jazbutyte *et al.*, 2008). No entanto, estudos realizados em anéis de aorta de camundongos mostraram que o bloqueio ou remoção dos receptores ER -  $\alpha$  e ER-  $\beta$  não foi capaz de inibir

completamente o efeito vasorelaxante do estrógeno, sugerindo o envolvimento de um diferente receptor de estrógeno nessa resposta (Freay *et al.*, 1997; Cruz *et al.*, 2006). Recentemente, um novo receptor de estrógeno acoplado à membrana foi identificado como receptor de estrógeno acoplado à proteína G-30, GPR30. Ao contrário dos efeitos genômicos a longo-prazo dos receptores nucleares clássicos, ER -  $\alpha$  e ER-  $\beta$ , o GPR30 está localizado na membrana plasmática e/ ou no retículo sarcoplasmático e pode mediar as ações diretas agudas do estrógeno na vasculatura (Thomas *et al.*, 2005; Prossnitz *et al.*, 2008).

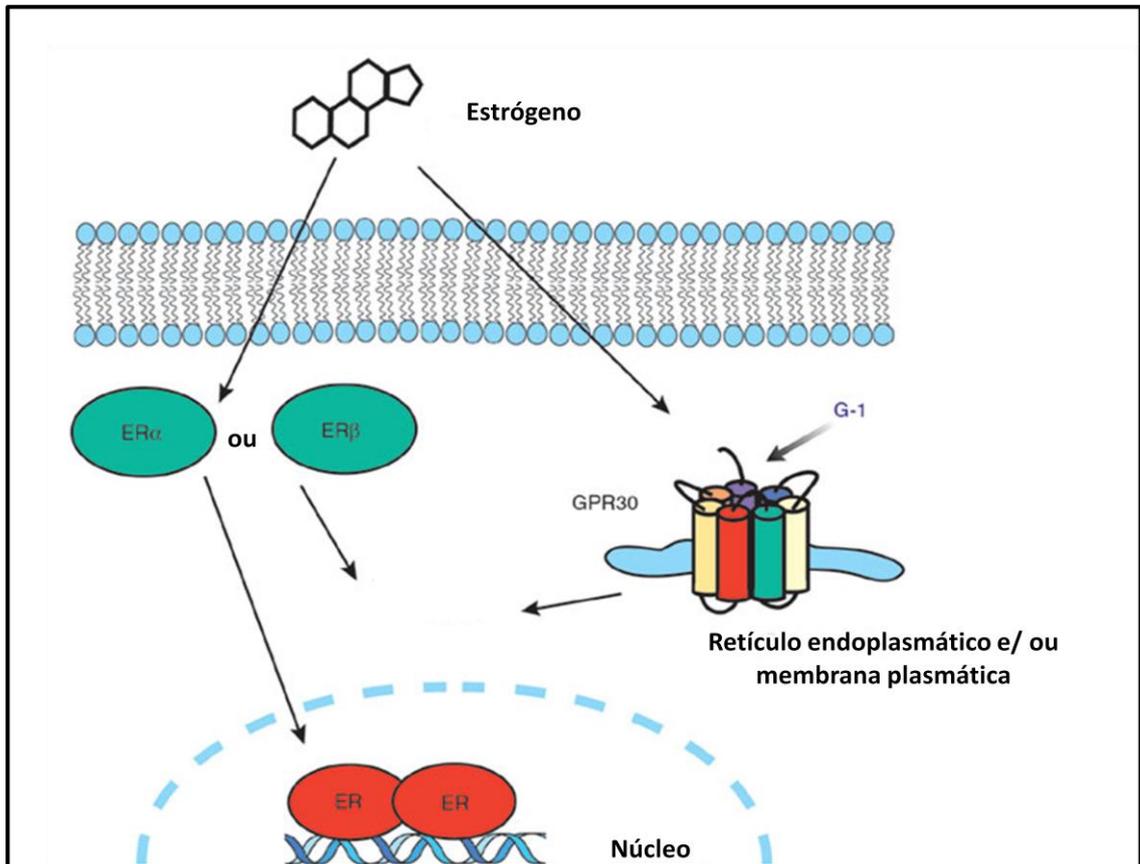


Figura 3: Representação esquemática dos receptores de estrógeno. ER $\alpha$ : receptor de estrógeno do tipo  $\alpha$ ; ER $\beta$ : receptor de estrógeno do tipo  $\beta$ ; GPR30: receptor de estrógeno acoplado à proteína G-30; G-1: agonista do receptor GPR30. *Fonte: Weatherman et al., 2006 (Modificado).*

### 1.7. Linhagem de ratos mRen2.Lewis

A linhagem mRen2.Lewis, que expressa o gene de renina em diferentes tecidos, é um modelo de rato hipertenso dependente de Ang II que apresenta uma diferença significativa entre os sexos no desenvolvimento da hipertensão arterial. Este animal é produzido a partir de um cruzamento sucessivo entre os animais mRen(2).27 com os ratos background Lewis (Chappell *et al.*, 2003; Chappell *et al.*, 2008).

De forma similar a outros modelos de hipertensão, incluindo a forma original de animais transgênicos mRen(2).27, os animais heterozigotos mRen2.Lewis apresentam diferenças importantes entre os gêneros em relação aos níveis de pressão arterial, com os machos apresentando valores de 50 a 60 mmHg superiores às fêmeas (Jessup *et al.*, 2006; Pendergrass *et al.*, 2008). No entanto, enquanto em outros modelos animais a depleção de estrógeno via ovariectomia possui pouco efeito sobre a pressão arterial, como nas ratas mRen(2).27 e SHR (Fang *et al.*, 2001), ratas jovens mRen2.Lewis ovariectomizadas apresentam um aumento importante da pressão arterial (Chappell, Gallagher *et al.* 2003; Chappell *et al.* 2006). Este aumento na pressão arterial é revertido pelo tratamento crônico com estrógeno exógeno e com o antagonista específico do receptor de Ang II (Chappell *et al.*, 2003).

Resultados interessantes já foram mostrados nas fêmeas mRen2.Lewis através da ativação do novo receptor de estrógeno, GPR30. Esse novo receptor foi identificado em cardiomiócitos das fêmeas mRen2.Lewis e o tratamento com G-1, agonista específico do GPR30, restaurou a disfunção do relaxamento e o remodelamento cardíaco induzidos pela dieta com sobrecarga de sal (Jessup *et al.*, 2010). O G-1 também produziu efeitos cardiovasculares

benéficos nas ratas mRen2.Lewis com depleção de estrógeno através da regulação dos componentes do SRA vascular (Lindsey *et al.*, 2009). Esses achados, em conjunto com os resultados anteriores que mostram a relação entre o estrógeno e SRA (Chappell *et al.*, 2003), sugerem que os efeitos cardiovasculares benéficos do estrógeno observados nas fêmeas mRen2.Lewis estão relacionados com sua influência negativa sobre a ativação do eixo Ang II/ ECA/ receptor AT<sub>1</sub> e que o receptor GPR30 está envolvido nessa resposta.

Poucos estudos na literatura mostram a participação do estrógeno na cardiomiopatia diabética. Assim, nossa primeira hipótese foi a de que depleção de estrógeno poderia alterar os efeitos cardíacos induzidos pelo diabetes nas ratas Sprague-Dawley. Diante das evidências que mostram o envolvimento do SRA na fisiopatologia da cardiomiopatia diabética, as fêmeas mRen2.Lewis são consideradas uma interessante ferramenta para estudar o papel do estrógeno no diabetes, uma vez que, nesse modelo os efeitos cardiovasculares benéficos do estrógeno estão relacionados com seu efeito inibitório sobre o SRA. Assim, nossa segunda hipótese foi que a combinação da ovariectomia e indução de diabetes nas ratas mRen2.Lewis poderia exacerbar os efeitos deletérios sobre o coração. Além disso, nós investigamos a participação do novo receptor de estrógeno, GPR30, sobre as alterações cardiovasculares induzidas pelo diabetes nas fêmeas mRen2.Lewis.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da depleção de estrógeno e a participação do receptor GPR30 sobre as alterações cardíacas induzidas pelo diabetes tipo I em ratas normotensas - Sprague-Dawley e hipertensas - mRen2.Lewis.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Avaliar o efeito da depleção de estrógeno em ratas Sprague-Dawley (SD) diabéticas sobre:

1. A evolução da pressão arterial sistólica (PAS) e do ganho de peso;
2. Os níveis plasmáticos de glicose, insulina, colesterol e triglicérides;
3. A função ventricular sistólica e diastólica;
4. A deposição de colágeno no ventrículo esquerdo;
5. A evolução do ciclo estral;

Avaliar o efeito da depleção de estrógeno e a participação receptor GPR30 em ratas mRen2.Lewis diabéticas sobre:

1. Os níveis de PAS, glicose e insulina;
2. A hipertrofia cardíaca e deposição de colágeno no ventrículo esquerdo;
3. A expressão de componentes do SRA no ventrículo esquerdo (receptor AT<sub>1</sub> e Mas, renina e angiotensinogênio);
4. A atividade enzimática da ECA2 e o metabolismo da Ang II no Ventrículo Esquerdo;

5. Os níveis de Óxido Nítrico (NO), expressão da eNOS e Nox2 no Ventrículo Esquerdo.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1.1. Animais**

Foram utilizados dois diferentes modelos animais para a realização do presente estudo: Sprague-Dawley (Parte I) e mRen2.Lewis (Parte II), uma linhagem que apresenta uma maior sensibilidade ao estrógeno. As ratas Sprague-Dawley Hannover (SD) foram provenientes do Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Hipertensão – Departamento de Fisiologia e Biofísica; ICB-UFMG. As ratas mRen2.Lewis (mRen) foram provenientes da colônia de animais transgênicos da Wake Forest University School of Medicine Hypertension Center. Os protocolos utilizados nesse estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais e da Wake Forest University (Winston-Salem, Carolina do Norte, EUA) sob os protocolos nº 118/11 e A10-214, respectivamente. Todos os animais foram mantidos em sala apropriada com ciclo claro-escuro de 12/12h e temperatura ambiente entre 22-24°C, separados aos pares em gaiolas plásticas adequadas e alimentados com ração apropriada e água filtrada *ad libitum*.

#### **3.1.2. Ovariectomia**

Entre 10-11 semanas de idade, parte dos animais foram submetidos à remoção cirúrgica de ambos ovários. As ratas SD e mRen foram anestesiadas com uma solução de quetamina (50mg/kg)/ xilazina (5mg/kg) e isoflurano 4% (respectivamente) e posteriormente submetidas à tricotomia da região paralombar esquerda (~ 2,0 cm). O ovário e parte do tecido adiposo gonadal

foram exteriorizados e amarrados com um fio de sutura, seguido da retirada do ovário. O local de incisão foi suturado e esterelizado com álcool iodado. O mesmo procedimento foi realizado com o ovário contra-lateral. No final da cirurgia os animais receberam antibiótico (Pentabiotic, Fort Dodge, dose; 0,2 mL; via intramuscular) e analgésico (Banamine, Schering-Plough; dose: 1mg/kg; via subcutânea) para a adequada recuperação cirúrgica.

### 3.1.3. Indução do diabetes experimental do tipo I

Após uma semana da remoção dos ovários, parte dos animais receberam uma dose única de estreptozotocina (STZ; 65 mg/kg; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA, via intraperitoneal) em solução de 0,1 M de tampão citrato para indução de Diabetes Mellitus tipo I ou veículo. Os níveis de glicose sanguíneos foram monitorados após 48 horas da injeção de STZ com o uso do glicosímetro Accu-check, Roche. Apenas os animais que apresentaram glicemia superior a 300mg/dL foram considerados diabéticos. Após 4 semanas da injeção de estreptozotocina ou veículo, todos os animais do presente estudo foram submetidos ao procedimento de eutanásia. A Figura 4 representa de forma esquemática o delineamento experimental realizado no presente estudo.

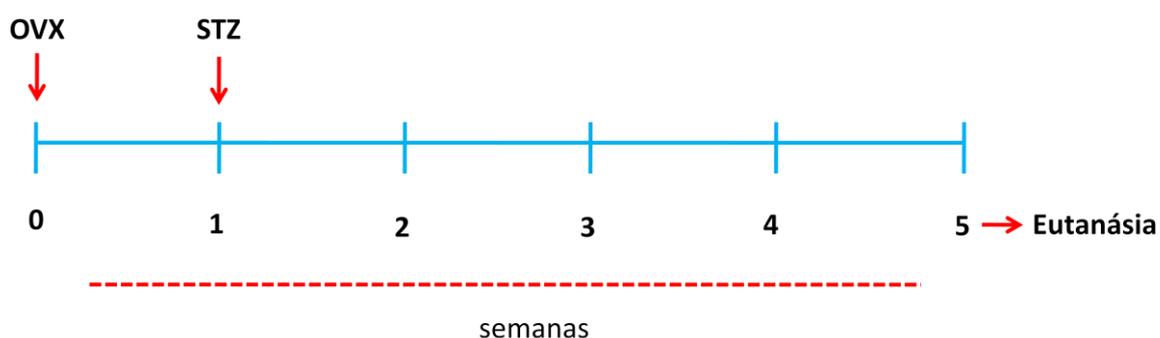


Figura 4: Delineamento experimental

#### **3.1.4. Medida da Pressão Arterial**

No dia anterior ao término do período experimental, a pressão arterial sistólica (PAS) foi determinada indiretamente a partir da técnica de plestimografia de cauda. Antes da determinação da PAS, os animais foram aquecidos por um período de 2-3 minutos em uma caixa equipada com lâmpada incandescente (200 W). Após este procedimento, um sensor pneumático e um esfigmomanômetro foram conectados à cauda do animal e a medida da PAS foi realizada com o uso dos equipamentos *AD Instruments NIBP Controller* (utilizado nas ratas SD) e *Collumbus Instruments Non Invasive Blood Instrument* (utilizado nas ratas mRen). Os dados foram registrados e analisados a partir de um sistema de transdução *Windaq- Aquisition e Analysis System*. Pelo menos três medidas da pressão arterial foram obtidas por animal, em cada sessão.

#### **3.1.5. Dosagens Plasmáticas**

Ao término do período experimental, os animais foram eutanasiados por decapitação. Os níveis glicose foram mensurados com o uso de um glicosímetro (Accu-check). A insulina plasmática foi determinada por elisa (EZRMI -13K, Millipore). As concentrações de triglicérides e colesterol, realizadas apenas nas ratas SD, foram determinadas pelo método enzimático (Labtest Diagnóstica – Minas Gerais, Brasil).

3.2. Parte 1: Métodos utilizados exclusivamente com os animais Sprague-Dawley

**3.2.1. Tratamento com Insulina**

No dia seguinte à indução de diabetes, parte dos animais diabéticos foram tratados com insulina (0-4 unidades, subcutâneo, duas vezes ao dia, Novolin, NovoNordisk) para reversão do quadro de hiperglicemia. Os animais passaram por esses procedimentos durante as 4 semanas restantes do período experimental. A dose de insulina utilizada variou de acordo com o nível glicêmico mensurado previamente a cada aplicação, de acordo com o quadro abaixo.

Valores Glicêmicos (mg/ dL)	Unidades de Insulina
0 - 100	0
100 - 150	1
150 - 250	2
250 - 350	3
superior a 350	4

### 3.2.2. Grupos Experimentais

Para a realização desta parte do estudo, os animais SD foram divididos em 6 grupos experimentais:

- Grupo **CTL**: animais intactos e não-diabéticos
- Grupo **STZ**: animais intactos e diabéticos
- Grupo **OVX**: animais ovariectomizados e não-diabéticos;
- Grupo **OVX-STZ**: animais ovariectomizados e diabéticos;
- Grupo **STZ + INS**: animais intactos e diabéticos que receberam insulina;
- Grupo **OVX-STZ + INS**: animais ovariectomizados e diabéticos que receberam insulina;

### 3.2.3. Evolução do Ciclo Estral

Durante as 2 últimas semanas do período experimental, entre 8:00 e 9:00 hs, o ciclo estral das ratas CTL e STZ foi avaliado através da análise dos tipos celulares presentes no esfregaço vaginal.

### 3.2.4. Ecocardiografia

O exame ecocardiográfico foi utilizado para a determinação do tamanho das câmaras cardíacas e função ventricular sistólica e diastólica. Os índices ecocardiográficos foram obtidos de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Sahn *et al.*, 1978). A ecocardiografia transtorácica foi realizada nos animais SD com o uso do aparelho de alta resolução VEVO 2100 equipado com transdutores de 16-21 MHz (Visual Sonics, Toronto, Canada). Os animais foram anestesiados com isoflurano (3.5%) por indução. Em seguida, os ratos foram submetidos à tricotomia do

tórax e posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa equipada com eletrodos eletrocardiográficos para o monitoramento contínuo da frequência cardíaca. A anestesia foi sustentada via cone nasal com isoflurano, 2,5% e a temperatura corporal do animal foi mantida a 37°C. Foram utilizadas as janelas longitudinal, transversal e apical (quatro e cinco câmaras). As seguintes medidas lineares foram realizadas nas imagens obtidas pelo modo-M: parede posterior do VE em diástole (PARDIA) e em sístole (PARSIS), diâmetro do VE ao final da diástole (VEDIA) e ao final da sístole (VESIS). Baseado nesses parâmetros foram calculados: o volume sistólico final do VE (VSF), volume diastólico final do VE (VDF), fração de ejeção (FE%), fração de encurtamento ( $\Delta D\%$ ) e débito cardíaco (DC). A espessura relativa da parede (ERP), um índice de morfometria avaliado para a caracterização da hipertrofia cardíaca (excêntrica/ concêntrica) foi calculada a partir da medida diastólica da parede do ventrículo esquerdo e da cavidade do ventrículo esquerdo:  $2 \times \text{PARDIA} / \text{VEDIA}$ . O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) foi mensurado a partir do espectro Doppler do influxo mitral e o pico de velocidade máxima na aorta e o tempo de ejeção (tempo que vai do início até o final do fluxo na válvula aórtica) foram mensurados a partir do espectro Doppler do fluxo aórtico.

### **3.2.5. Análise da Hipertrofia Ventricular Esquerda**

Após o procedimento de decapitação, o coração foi rapidamente retirado. O ventrículo esquerdo (VE) foi dissecado e posteriormente pesado em balança digital (Denver Instrument APX-323). A hipertrofia ventricular esquerda foi avaliada pelo peso do VE corrigido pelo comprimento da tíbia esquerda (Yin et al. 1980), que foi dissecada e medida com o uso de um paquímetro (Vernier Calipers).

### 3.2.6. Análise Histológica

Após pesagem, o VE foi seccionado em seu eixo transversal e a região intermediária foi utilizada para análise histológica. O material foi fixado em solução de formalina 10% por 24 horas, seguido de desidratação sequencial em álcoois e inclusão em blocos de parafina. A seguir, secções transversas de 6 µm foram desparafinizadas e rehidratadas para a posterior coloração com Picrosirius Red (0,1% por 60 minutos) para a determinação dos níveis de colágeno no VE. As secções foram posteriormente lavadas em solução de ácido acético glacial, desidratadas, clareadas e montadas. Imagens intersticiais (×200) foram capturadas em campo claro e luz polarizada usando Spot Advanced software 4.0.9 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) conectado ao microscópio Olympus BX60 40 (Olympus America, Center Valley, PA). A razão entre os pixels positivamente marcados, correspondente ao colágeno, com os pixels não marcados foram calculados usando Adobe Photoshop Creative Suite 5.5 (Adobe Systems, San Jose, CA).

### 3.3. Parte 2: Métodos utilizados exclusivamente com os animais mRen2.Lewis

#### 3.3.1. Grupos experimentais

Para a realização desta parte do estudo, os animais mRen2.Lewis foram divididos em 4 grupos experimentais:

- Grupo **mRen CTL**: animais intactos e não-diabéticos;
- Grupo **mRen STZ**: animais intactos e diabéticos;
- Grupo **mRen OVX**: animais ovariectomizados e não-diabéticos;
- Grupo **mRen OVX-STZ**: animais ovariectomizados e diabéticos;

### 3.3.2. Tratamento com o agonista do receptor GPR30, G1:

Subgrupos de animais OVX-STZ foram submetidos ao tratamento com G1, um agonista específico do novo receptor de estrógeno (GPR30). O G1 (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) foi dissolvido em 50% de solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e administrado via bomba-osmótica (Alzet). A bomba-osmótica foi implantada 2 dias após a injeção de STZ, na dose de 0,2 mg/kg/dia; ip. Os animais controles receberam veículo (DMSO). As ratas ovariectomizadas diabéticas foram divididas em 3 grupos experimentais:

- Grupo **CTL**: animais intactos e não-diabéticos;
- Grupo **OVX-STZ + veículo**: animais ovariectomizados e diabéticos que receberam veículo;
- Grupo **OVX-STZ + G1**: animais ovariectomizados e diabéticos que receberam o tratamento com G1;

### 3.3.3. Análise Histológica

Para a realização da análise histológica da região intermediária do VE das ratas mRen, secções transversas de VE passaram pelos processos de fixação, desidratação e inclusão em blocos de parafina, conforme descrito anteriormente no item 3.2.6. A coloração com Picrus – Sirius, análise em microscópio e quantificação dos níveis de colágeno no VE foi feita de forma semelhante à realizada com as ratas SD (item 3.2.6). Para a análise morfométrica, secções transversas de cada animal foram coradas com hematoxilina e eosina. Após a coloração, as secções foram desidratadas,

clareadas e montadas. Uma média de 50 a 100 cardiomiócitos por corte foram fotografados (Axion Observer Inverted Microscope, Zeiss) e medidos transversalmente à região correspondente ao núcleo celular com o auxílio do software *Axion Vision Rel 4.8*. Foram quantificados apenas os cardiomiócitos em cortes longitudinais com o núcleo e limites celulares visíveis.

#### **3.3.4. Western Blotting:**

Após a remoção do coração, secções de VE foram rapidamente coletadas em nitrogênio líquido e estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram homogenizadas em tampão de lise contendo, em concentrações finais: 10 mM HEPES (pH 7,4), 125 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 10  $\mu\text{g/ml}$  leupeptina, 10  $\mu\text{g/ml}$  pepstatina A e 1 mM PMSF. O homogenato foi centrifugado a 2000 seguido de 100 000 g por 1 hora a  $4^{\circ}\text{C}$ . A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BioRad Kit – Bio-Rad) nas frações de membrana (pellet) e citosólica (sobrenadante). As amostras foram separadas em gel de eletroforese e posteriormente eluídas do gel para membranas de PVDF (Bio-Rad) por 1 h a 100V. Para bloqueio das ligações inespecíficas, a membrana foi incubada com leite em pó sem gordura 5% e Tween 20 0,1% durante 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram incubadas com policlonal anti-AT<sub>1</sub> (1: 250; Alomone Labs, Israel), policlonal anti-mas (1: 200; Alomone Labs, Israel), monoclonal anti-eNOS (1: 500; BD Transduction Laboratories, Lexington, Ky., USA), monoclonal anti-Nox 2 (1: 1.000; BD Transduction Laboratories), anti-renina (doação do Laboratório de Dr. Inagami, Vanderbilt University, Nashville), anti-angiotensinogênio (contra os resíduos

25–34 (sequência da Ang I) *overnight* a 4 °C. Em seguida, os blots foram incubados com o específico anticorpo secundário, anti-coelho (1: 5.000; Amersham Biosciences, Piscataway, N.J., USA) ou anti-camundongo (1: 3.000; Amersham Biosciences). Foi utilizado o substrato *Pierce Super Signal West Pico Chemiluminescent* sobre as membranas que foram sequencialmente expostas a filmes sensíveis à quimioluminescência (Amersham Hyperfilm - Amersham Biosciences). A quantificação do sinal foi realizada com o uso do programa de análise de imagem (MCID) e as densidades ópticas foram expressas como a razão entre a densidade óptica da proteína de interesse e do normalizador EF1- $\alpha$  (*Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1*), para as frações de membrana e citosólica. Os dados foram expressos como porcentagem dos controles.

### **3.3.5. Determinação dos níveis de Óxido Nítrico (NO) no VE**

Os níveis de nitrito presentes nas frações citosólicas do VE foram medidos através de um analisador de quimioluminescência baseado nos níveis de NO (Sievers, Inc; GE Analytical Instruments, Boulder, CO). Brevemente, o nitrito presente na amostra é reduzido em NO em uma câmara, o qual, em seguida reage com ozônio formando um composto quimioluminescente mais estável. O nitrito é reduzido na câmara na presença de iodeto de sódio em ácido glacial acético. A quantidade de luz detectada em um fotodiodo é equivalente à quantidade de NO liberado na câmara, sendo, portanto, correspondente à

quantidade de nitrito presente na amostra. A voltagem registrada é proporcional à quantidade de luz detectada no fotodiodo (Bryan *et al.*, 2005).

### 3.3.6. Atividade Enzimática

As atividades da ECA2 e o metabolismo da Ang II foram determinados nas frações solubilizadas de membrana cardíaca baseados no metabolismo da <sup>125</sup>I-Ang II como substrato. O tecido cardíaco foi pesado e homogeneizado em solução HEPES 10 mmol/L (pH 7,4), NaCl 120 mmol/L e ZnCl<sub>2</sub> 10 μmol/L, seguido de centrifugação a 30000g por 20 minutos. O sobrenadante foi removido, as membranas foram resuspensas em tampão contendo Triton X-100 0,5% e incubadas *overnight* em gelo a 4°C. Após centrifugação, a porção solúvel foi incubada com <sup>125</sup>I-Ang II em tampão HEPES sem inibidores para a análise do metabolismo da Ang II e na presença dos inibidores, na concentração de 10 μmol/L: amastatina, bestatina, SCH39370 (inibidor da NEP), quimostatina, lisinopril, benzil succinato e Z-prolil-prolinal, com exceção do C16 (inibidor específico da ECA2) para a análise da atividade da ECA2. As amostras foram incubadas a 37°C de 10 a 120 minutos e a reação foi bloqueada com a adição de ácido fosfórico 1%. O produto da reação foi centrifugado e o sobrenadante foi filtrado em membranas de 0.22-μm antes da análise em *high-performance liquid chromatography (HPLC)*. Os picos de radioatividade das frações eluídas foram identificados em um detector gama (BioScan) e os dados foram analisados com um software de aquisição Shimadzu (versão 7.2.1). A atividade enzimática da ECA2 foi expressa como a quantidade de Ang-(1-7) gerada por minuto por miligrama de proteína, que foi

inibida pela adição de 10  $\mu\text{mol/L}$  do inibidor enzimático específico. O metabolismo da Ang II foi representado como a % de Ang II remanescente, que corresponde à diferença entre quantidade total de Ang II marcada com a quantidade de metabólitos formados a partir da Ang II marcada. A marcação da Ang II com iodo foi realizada pelo método de cloramina T e purificada por HPLC (Ferrario *et al.*, 2005).

### **3.4. Análise Estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Para a análise estatística da evolução do ganho de peso foi utilizado o teste *Two - way ANOVA* seguido do pós-teste de Bonferroni. Para as análises dos demais resultados foi utilizado *One – Way ANOVA* seguido de Newman-Keuls. O valor de  $p < 0,05$  foi previamente fixado para identificar diferença estatística. Esses testes foram realizados com o auxílio do programa *GraphPad Prism* (versão 4).

## 4. Discussão

Diversos estudos mostram o efeito benéfico do estrógeno sobre o sistema cardiovascular. No entanto, poucos estudos na literatura investigam se o estrógeno possui um efeito cardioprotetor no diabetes. Nesse estudo, avaliamos se a depleção do estrógeno interfere no desenvolvimento dos efeitos adversos cardíacos induzido pelo diabetes e se a ativação do novo receptor de estrógeno GPR30 está envolvida nesse processo. A comparação entre ratas diabéticas que sofreram a remoção dos ovários com ratas intactas nos permitiu identificar a participação do estrógeno sobre a disfunção cardiovascular induzida pelo diabetes.

Nas fêmeas SD, a injeção de estreptozotocina promoveu um aumento do diâmetro da câmara ventricular ao final da sístole e diástole e uma redução da espessura relativa da parede do VE, indicando que as fêmeas diabéticas apresentam uma dilatação ventricular. Além disso, a indução de diabetes produziu uma redução importante no peso do VE/ corrigido pela tibia nas ratas SD intactas. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostram o efeito do diabetes induzido pela injeção de estreptozotocina sobre o tamanho das câmaras cardíacas (Akula *et al.*, 2003; Neomoto *et al.*, 2006). Essas alterações anatômicas podem comprometer o desempenho cardíaco (Tei *et al.*, 1995; Neomoto *et al.*, 2006), o que está de acordo com a redução da fração de ejeção e encurtamento observada nas fêmeas diabéticas, que foi associada com um maior tempo de ejeção. Embora alguns estudos mostram que a disfunção diastólica no diabetes normalmente se desenvolve antes de alterações na função sistólica (Fiordaliso *et al.*, 2000; Frustaci *et al.*, 2000; Kajstura *et al.*, 2000), o prejuízo da performance do miocárdio é um fenômeno

frequentemente observado no diabetes induzido pela estreptozotocina (Neomoto *et al.*, 2006). Por outro lado, embora não tenha sido observada diferença estatística, as ratas diabéticas apresentaram um aumento de ~15% no tempo de relaxamento isovolumétrico, o que indica um prejuízo do enchimento ventricular. Alguns estudos mostram a relação entre o prejuízo na complacência cardíaca e o aumento da deposição de colágeno no miocárdio (Weber *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1994). A injeção de estreptozotocina induziu um aumento nos níveis de colágeno no VE das ratas STZ, o que por sua vez pode promover um aumento da rigidez ventricular e desencadear um prejuízo da função diastólica. Dessa forma, os resultados do presente estudo obtidos com as ratas SD corroboram com os dados já existentes na literatura que mostram que a indução de diabetes através da injeção de estreptozotocina promove um efeito deletério sobre a função e estrutura cardíaca (Akula *et al.*, 2003; Nemoto *et al.*, 2006; Malfitano *et al.*, 2012).

Nosso estudo está de acordo com trabalhos anteriores que sugerem um papel protetor do estrógeno sobre o miocárdio em mulheres na pós-menopausa com ou sem terapia de reposição hormonal ou em ratas hipertensas (Pines, Fisman *et al.* 1993; Shenoy *et al.*, 2009; Schierbeck *et al.*, 2012). As ratas OVX apresentaram um aumento do peso do VE/ corrigido pela tibia e da cavidade do VE ao final da diástole, o que está de acordo com a menor ERP, indicando uma hipertrofia excêntrica do VE e dilatação ventricular. Assim, uma vez que a injeção de estreptozotocina e a ovariectomia exerceram efeitos diretos sobre o miocárdio, nós esperávamos que a depleção de estrógeno nas ratas diabéticas poderia exarcebar os efeitos deletérios do diabetes sobre o coração. Contudo, a realização da ovariectomia nas ratas diabéticas não alterou o efeito do

diabetes sobre esses parâmetros, o que sugere que o efeito cardioprotetor do estrógeno é abolido na condição de diabetes nas fêmeas SD. De fato, nossos dados mostram que as ratas OVX-STZ não apresentaram um efeito somatório das duas intervenções, diabetes e ovariectomia. A reversão das alterações cardíacas observadas nas ratas OVX-STZ que receberam o tratamento com insulina é mais um indicativo da ausência de um efeito aditivo dos dois fenômenos. Esses resultados sugerem ainda um efeito mais pronunciado do diabetes sobre o miocárdio em relação à ovariectomia, indicando que as alterações cardíacas observadas nas ratas OVX-STZ parecem ser uma resposta unicamente relacionada a condição hiperglicemia/ hipoinsulinemia induzida pela injeção da estreptozotocina.

Embora a depleção do estrógeno não tenha modificado os efeitos deletérios cardíacos induzidos pelo diabetes, é interessante observar que alguns estudos mostram que mulheres com diabetes tipo I frequentemente apresentam um prejuízo da função ovariana, disfunção sexual e ciclos menstruais irregulares (Dorman et al., 2001; Salonia *et al.*, 2006; Maric & Sullivan, 2008; Maric, 2009). No presente estudo, a redução no peso do útero das ratas diabéticas intactas e sua restauração após o tratamento com insulina indicam um efeito da redução de insulina sobre o sistema reprodutor. Além disso, as ratas STZ apresentaram alteração importante no ciclo estral, uma vez que a maior parte delas permaneceram em diestro durante os 14 dias avaliados. Embora os dados da literatura ainda sejam inconclusivos e alguns trabalhos mostram que os níveis de estrógeno podem reduzir ou não se modificar no diabetes, o hiperandrogenismo parece ser a alteração mais consistente observada no diabetes tipo I (Wells *et al.*, 2005; Maric, 2009).

Dessa forma, a redução do peso do útero e o ciclo irregular observado nas ratas STZ podem ser consequência de uma alteração nos níveis dos hormônios sexuais. Os níveis hormonais alterados podem estar relacionados com a redução do tecido adiposo, comumente observada nesse modelo de diabetes experimental, e também com a ausência de desenvolvimento dos folículos. De fato, a literatura mostra que o desequilíbrio entre os hormônios sexuais é um forte fator envolvido com a perda da proteção do sexo feminino na condição de diabetes (Wells *et al.*, 2005; Maric & Sullivan, 2008).

Nos animais mRen2.Lewis, a depleção de estrógeno nos animais diabéticos exerceu efeitos importantes sobre o sistema cardiovascular. As fêmeas mRen OVX-STZ apresentaram um aumento significativo nos níveis de pressão arterial em relação às mRen STZ e OVX, enquanto a ovariectomia e a injeção de estreptozotocina isoladas não exerceram efeitos diretos sobre o grau de hipertensão arterial. Estudos anteriores já mostraram que a remoção dos ovários realizada em fêmeas mRen2.Lewis com 4 semanas de idade produziu um aumento significativo da pressão arterial (Chappell *et al.*, 2003; Chappell *et al.*, 2008; Lindsey *et al.*, 2009), o que indica a participação do estrógeno sobre o desenvolvimento da hipertensão arterial nessa linhagem de ratos. No presente estudo, a ovariectomia não produziu efeitos diretos sobre a pressão arterial, no entanto, a remoção cirúrgica dos ovários foi realizada em uma fase mais tardia (entre 10- 11 semanas de idade). Esses resultados sugerem que a sensibilidade ao estrógeno neste modelo parece depender da fase de vida em que a ovariectomia é realizada. De fato, estudos ontogenéticos sugerem que o desenvolvimento de hipertensão arterial em ratos depende de

um período crítico do desenvolvimento o qual o animal passa por uma determinada intervenção (Zicha & Kunes, 1999; Chappell *et al.*, 2008).

Estudos anteriores mostram que o efeito da injeção de estreptozotocina sobre os níveis de pressão arterial depende de diferentes aspectos, como modelo animal, dose utilizada e duração do diabetes (Akula *et al.*, 2003; Landau *et al.*, 2008). No presente estudo, não observamos o efeito direto do diabetes sobre a pressão arterial nas ratas mRen2.Lewis, em contrapartida, o exarcebamento no grau de hipertensão arterial foi observado quando o diabetes foi desenvolvido nas ratas ovariectomizadas, OVX-STZ. O fato do aumento nos níveis de pressão arterial ter sido atenuado nas fêmeas OVX-STZ tratadas com G-1 sugere que o efeito hipotensor do estrógeno está, pelo menos em parte, relacionado à ativação do novo receptor de estrógeno, GPR30. De fato, Lindsey *et al.* (2009) mostraram que a ativação *in vivo* do GPR30 foi capaz de reduzir os níveis aumentados de pressão arterial nas ratas mRen2.Lewis ovariectomizadas. Nesse estudo, o efeito do G-1 sobre a pressão arterial foi associado a uma menor resposta vasoconstritora à Ang II e alterações na expressão dos componentes do SRA vascular. Já está bem definido na literatura que a disfunção endotelial é uma das alterações frequentemente observadas na condição de diabetes (Clarkson *et al.*, 1995; Pieper *et al.*, 1998; Schaan *et al.*, 2010). Assim, embora não tenha sido explorado no presente estudo os mecanismos envolvidos com o aumento da pressão arterial nas ratas OVX-STZ, a ausência do estrógeno e insulina podem ter exercido um efeito deletério somatório sobre a função vascular e ter contribuído com o aumento dos níveis de pressão arterial nesses animais.

Já está bem estabelecido na literatura que o aumento nos níveis de pressão arterial pode exercer efeitos importantes sobre a hemodinâmica cardíaca e aumentar a susceptibilidade à ocorrência de um dano cardíaco (Folkow *et al.*, 1982; Kannel *et al.*, 1987). O remodelamento cardíaco é um importante mecanismo envolvido com a disfunção cardíaca no diabetes (Akula *et al.*, 2003; Neomoto *et al.*, 2006). Alguns estudos mostram que o estrógeno pode modular o processo de remodelamento cardíaco reduzindo o aumento da deposição de colágeno no miocárdio em modelos animais de envelhecimento, hipertensão e infusão crônica de Ang II (Shenoy *et al.*, 2009; Piro *et al.*, 2010). A participação dos hormônios sexuais sobre a fibrose cardíaca induzida pelo diabetes é pouco explorada na literatura. No estudo de Bupha-Inter *et al.* (2011), ratas diabéticas com os ovários intactos apresentaram um aumento na deposição de colágeno no coração quando comparadas com as ratas diabéticas ovariectomizadas. No entanto, esse aumento na fibrose cardíaca parece ter sido uma resposta adaptativa para compensar a dilatação cardíaca induzida pelo diabetes. O presente estudo mostrou que a indução de diabetes nas ratas mRen2.Lewis promoveu respostas distintas sobre o remodelamento cardíaco de acordo com a presença ou não dos hormônios sexuais. As ratas diabéticas que sofreram a remoção dos ovários apresentaram um aumento nos níveis de colágeno no miocárdio em relação àquelas que possuíam os ovários íntegros. Além disso, a ativação seletiva do receptor GPR30 preveniu o aumento da produção de colágeno nas ratas ovariectomizadas diabéticas, o que sugere a participação desse receptor sobre o remodelamento cardíaco induzido pelo diabetes nas ratas mRen2.Lewis.

Existem evidências de que a atividade cardioprotetora do estrógeno parece estar relacionada com sua modulação sobre o SRA (Chappell *et al.*, 2003). Vários estudos mostram que a ativação do SRA cardíaco está diretamente envolvida com as complicações cardíacas observadas na condição de diabetes (Fiordaliso *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2008). De fato, os animais mRen2.Lewis diabéticos do presente estudo apresentaram um aumento importante da expressão do receptor AT<sub>1</sub> no coração, corroborando com dados já existentes na literatura que mostram o efeito do aumento da atividade do eixo Ang II/ ECA/ AT<sub>1</sub> sobre a produção de colágeno no coração diabético (Fiordaliso *et al.*, 2000; Frustaci *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2008). No entanto, não observamos diferenças entre os animais diabéticos intactos e ovariectomizados, sugerindo que a ovariectomia não modificou o efeito do diabetes sobre a expressão do receptor AT<sub>1</sub> no VE. A expressão cardíaca do receptor Mas não alterou entre os grupos experimentais após a indução do diabetes e/ ou depleção de estrógeno, no entanto, a razão AT<sub>1</sub>: Mas foi significativamente maior nas fêmeas OVX-STZ em relação às STZ e OVX. Interessantemente, a ovariectomia induziu um aumento da atividade da ECA2 cardíaca, o que corrobora com os trabalhos que mostraram que o estrógeno exerce um papel modulador sobre a regulação dessa enzima (Brosnihan *et al.*, 2008; Neves *et al.*, 2008). A indução do diabetes modificou esse efeito, como observado nas fêmeas OVX-STZ que apresentaram uma menor atividade da ECA2. Poucos estudos na literatura investigam o papel da ECA2 no coração em modelos experimentais de diabetes. Alguns estudos mostram uma redução da expressão da ECA2 em resposta ao diabetes, enquanto em outros o diabetes não modifica sua expressão (Ye *et al.*, 2004; Landau *et al.*, 2008). No

presente estudo, a redução da atividade da ECA2 é confirmada pela maior porcentagem de Ang II remanescente nas fêmeas OVX-STZ em relação às OVX, indicando que menos Ang II está sendo degradada nesses animais. A menor taxa de formação de  $^{125}\text{I}$ -Ang-(1-7) a partir da  $^{125}\text{I}$ -Ang II nas fêmeas OVX-STZ também corrobora esse achado. O aumento nos níveis cardíacos de Ang II pode estar envolvido com as alterações cardíacas observadas nas ratas mRen OVX-STZ. Malfitano *et al* (2012) mostraram que a atenuação da disfunção cardíaca induzida pelo diabetes, através do tratamento com captopril, foi associada a menores níveis de Ang II no coração e aumento da atividade da ECA2. Dessa forma, em conjunto com os dados da expressão do receptor  $\text{AT}_1$ , nossos resultados sugerem que o diabetes modifica o balanço do SRA cardíaco e a depleção do estrógeno parece modular esse efeito. No entanto, a ausência de diferença estatística entre os animais diabéticos intactos e ovariectomizados sugere que o diabetes exerce um efeito mais pronunciado sobre o SRA. Os resultados obtidos com o G-1 confirmam a hipótese de existência de modulação do SRA induzida pelo diabetes, uma vez que o tratamento com o agonista do receptor GPR30 não modificou a expressão do receptor  $\text{AT}_1$  nas fêmeas mRen2.Lewis ovariectomizadas diabéticas.

Além das alterações no SRA, nossos resultados mostram uma redução da expressão da eNOS no coração das ratas mRen2.Lewis diabéticas. A depleção de estrógeno nos animais diabéticos não modificou esse efeito. No entanto, o diabetes e a ovariectomia produziram um efeito direto sobre a concentração cardíaca de nitrito, usada como um indicador da biodisponibilidade de NO. A redução dos níveis de nitrito nos animais diabéticos está de acordo com os níveis reduzidos da expressão da eNOS

(Ren *et al.*, 2008), o que não foi observado nas fêmeas OVX. Jessup *et al.* (2011) mostraram que a expressão cardíaca da eNOS não alterou após a depleção de estrógeno nas ratas mRen2.Lewis, enquanto a expressão da nNOS aumentou significativamente e estava relacionada com os menores níveis de NO. Esses achados indicam um outro mecanismo que pode estar envolvido com a redução dos níveis de NO nas ratas ovariectomizadas. Interessantemente, o tratamento com G-1 foi capaz de aumentar a expressão cardíaca de eNOS nas ratas diabéticas ovariectomizadas, indicando um possível mecanismo envolvido com o efeito da ativação do receptor GPR30 sobre a injúria cardíaca induzida pelo diabetes.

O estresse oxidativo é um mecanismo importante envolvido com as complicações cardíacas relacionadas com o diabetes e apresenta um papel chave no remodelamento cardíaco (Fiordaliso *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2008). No presente estudo, as fêmeas mRen2.Lewis diabéticas ovariectomizadas apresentaram um aumento na expressão cardíaca de Nox2, que é uma importante subunidade da NADPH e fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Inoguchi *et al.*, 2000). Esse resultado indica uma maior produção de ERO nesses animais, podendo ser uma possível explicação para a fibrose cardíaca observada nos animais OVX-STZ. Como as ERO podem atuar como transdutoras de sinais para a Ang II em cardiomiócitos (Bendall *et al.*, 2002; Modesti *et al.*, 2005), nós acreditamos que a ativação do SRA pode estar relacionada com um aumento da produção de estresse oxidativo nas fêmeas OVX-STZ, o que induziu um prejuízo no remodelamento cardíaco. As ratas diabéticas intactas não apresentaram essa alteração no remodelamento cardíaco, apesar da ativação do SRA cardíaco. Como o estrógeno pode regular

a produção de estresse oxidativo no coração (Wang *et al.*, 2010; Barp *et al.*, 2012), a presença do estrógeno nas fêmeas intactas pode ter prevenido o surgimento dos danos cardíacos induzidos pelo diabetes através do efeito modulador do estrógeno sobre a produção de ERO.

## **5. Conclusão**

Os dados do presente estudo mostram que o estrógeno pode exercer um papel cardioprotetor sobre o desenvolvimento das injúrias cardíacas induzidas pelo modelo experimental de diabetes tipo I na presença de hipertensão arterial. A depleção de estrógeno via ovariectomia não modificou o efeito do diabetes sobre a função e remodelamento cardíaco nos animais normotensos. Por outro lado, as ratas diabéticas hipertensas mRen2.Lewis apresentaram maior incidência de microinfartos e fibrose cardíaca quando sofreram a remoção dos ovários, sugerindo que nessa condição o estrógeno exerça um papel modulador importante sobre o remodelamento cardíaco induzido pelo diabetes. O tratamento das ratas mRen OVX-STZ com o agonista do receptor GPR30 (G1) preveniu o efeito somatório das duas intervenções, diabetes e ovariectomia, sobre a produção de colágeno e reduziu o grau de hipertensão arterial, mostrando o papel cardioprotetor desse novo receptor na condição de diabetes. Além disso, a ativação do receptor GPR30 foi capaz de reverter a redução da expressão cardíaca da eNOS, sem alterar o efeito do diabetes sobre a ativação do SRA cardíaco. Em conjunto, nossos resultados mostram que a ativação seletiva do novo receptor de estrógeno GPR30 nas

ratas mRen2.Lewis previne os efeitos deletérios cardíacos observados com a concomitante ausência de estrógeno e insulina através da redução da pressão arterial e preservação da via da eNOS. Além disso, esses dados reforçam o benefício do uso do agonista específico do GPR30 como uma nova estratégia farmacológica capaz de minimizar os efeitos adversos comumente observados com a terapia de reposição hormonal tradicional que possui todos os receptores de estrógeno como alvo.

## 6. Referências Bibliográficas

Akula A.; Kota M. K.; Gopisetty S. G.; Chitrapu R. V.; Kalagara M.; Kalagara S.; Veeravalli K. K. and Gomedhikam J. P. (2003). "Biochemical, histological and echocardiographic changes during experimental cardiomyopathy in STZ-induced diabetic rats." Pharmacol Res **48**(5): 429-435.

Arozal W.; Watanabe K.; Veeraveedu P. T.; Ma M.; Thandavarayan R. A.; Suzuki K.; Tachikawa H.; Kodama M. and Aizawa Y. (2009). "Effects of angiotensin receptor blocker on oxidative stress and cardio-renal function in streptozotocin-induced diabetic rats." Biol Pharm Bull **32**(8): 1411-1416.

Association A. D. (2011). "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." **34**(1): S62-69.

Babiker F. A.; De Windt L. J.; van Eickels M.; Grohe C.; Meyer R. and Doevendans P. A. (2002). "Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function." Cardiovasc Res **53**(3): 709-719.

Balligand J. L. and Cannon P. J. (1997). "Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(10): 1846-1858.

Barouch L. A.; Harrison R. W.; Skaf M. W.; Rosas G. O.; Cappola T. P.; Kobeissi Z. A.; Hobai I. A.; Lemmon C. A.; Burnett A. L.; O'Rourke B.; Rodriguez E. R.; Huang P. L.; Lima J. A.; Berkowitz D. E. and Hare J. M. (2002). "Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms." Nature **416**(6878): 337-339.

Barp J S. C., Campos C, Llesuy SF, Araujo AS, Belló-Klein A (2012). "Influence of ovariectomy on cardiac oxidative stress in a renovascular hypertension model." Can J Physiol Pharmacol **90**(9): 1229-1234.

Barret-Connor E.; Criqui M. H.; Klauber M. R. and Holdbrook M. (1981). "Diabetes and hypertension in a community of older adults." Am J Epidemiol **113**(3): 276-284.

Barrett-Connor E C. B., Wingard DL, Edelstein SL (1991). "Why is diabetes mellitus a stronger risk factor for fatal ischemic heart disease in women than in men." JAMA **265**: 627-631.

Barrett-Connor E W. D. (1983). "Sex differential in ischemic heart disease mortality in diabetics: a prospective population-based study." Am J Epidemiol **118**: 489-496.

Beckman J. A.; Goldfine A. B.; Gordon M. B. and Creager M. A. (2001). "Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans." Circulation **103**(12): 1618-1623.

Bendall J. K.; Cave A. C.; Heymes C.; Gall N. and Shah A. M. (2002). "Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice." Circulation **105**(3): 293-296.

Bennett R. A. and Pegg A. E. (1981). "Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin." Cancer Res **41**(7): 2786-2790.

Bindom S. M.; Hans C. P.; Xia H.; Boulares A. H. and Lazartigues E. (2010). "Angiotensin I-converting enzyme type 2 (ACE2) gene therapy improves glycemic control in diabetic mice." Diabetes **59**(10): 2540-2548.

Bolzan A. D. and Bianchi M. S. (2002). "Genotoxicity of streptozotocin." Mutat Res **512**(2-3): 121-134.

Brosnihan K. B.; Hodgin J. B.; Smithies O.; Maeda N. and Gallagher P. (2008). "Tissue-specific regulation of ACE/ACE2 and AT1/AT2 receptor gene expression by oestrogen in apolipoprotein E/oestrogen receptor-alpha knock-out mice." Exp Physiol **93**(5): 658-664.

Brosnihan K. B.; Senanayake P. S.; Li P. and Ferrario C. M. (1999). "Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system." Braz J Med Biol Res **32**(4): 373-381.

Brower G. L.; Gardner J. D. and Janicki J. S. (2003). "Gender mediated cardiac protection from adverse ventricular remodeling is abolished by ovariectomy." Mol Cell Biochem **251**(1-2): 89-95.

Bryan N. S.; Fernandez B. O.; Bauer S. M. (2005). Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. Nat Chem Biol **1**:290-297.

Bugger H. and Abel E. D. (2009). "Rodent models of diabetic cardiomyopathy." Dis Model Mech **2**(9-10): 454-466.

Bupha-Intr T.; Oo Y. W. and Wattanapermpool J. (2011). "Increased myocardial stiffness with maintenance of length-dependent calcium activation by female sex hormones in diabetic rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **300**(5): H1661-1668.

Chappell M. C.; Gallagher P. E.; Averill D. B.; Ferrario C. M. and Brosnihan K. B. (2003). "Estrogen or the AT1 antagonist olmesartan reverses the development of profound hypertension in the congenic mRen2. Lewis rat." Hypertension **42**(4): 781-786.

Chappell M. C.; Westwood B. M. and Yamaleyeva L. M. (2008). "Differential effects of sex steroids in young and aged female mRen2.Lewis rats: a model of estrogen and salt-sensitive hypertension." Gend Med **5 Suppl A**: S65-75.

Chappell M. C.; Yamaleyeva L. M. and Westwood B. M. (2006). "Estrogen and salt sensitivity in the female mRen(2). Lewis rat." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **291**(5): R1557-1563.

Chen Z.; Yuhanna I. S.; Galcheva-Gargova Z.; Karas R. H.; Mendelsohn M. E. and Shaul P. W. (1999). "Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen." J Clin Invest **103**(3): 401-406.

Clarkson P C. D., Yue DK (1995). "Endothelial dysfunction in insulindependent diabetes mellitus relates to the duration of disease and LDLcholesterol level." Circulation **92**: I-1107.

Connelly K. A.; Kelly D. J.; Zhang Y.; Prior D. L.; Martin J.; Cox A. J.; Thai K.; Feneley M. P.; Tsoporis J.; White K. E.; Krum H. and Gilbert R. E. (2007). "Functional, structural and molecular aspects of diastolic heart failure in the diabetic (mRen-2)<sup>27</sup> rat." Cardiovasc Res **76**(2): 280-291.

Cooper M. E. (2004). "Importance of advanced glycation end products in diabetes-associated cardiovascular and renal disease." Am J Hypertens **17**(12 Pt 2): 31S-38S.

Cruz M. N.; Douglas G.; Gustafsson J. A.; Poston L. and Kublickiene K. (2006). "Dilatory responses to estrogenic compounds in small femoral arteries of male and female estrogen receptor-beta knockout mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(2): H823-829.

Dahlquist G. (1993). "Etiological aspects of insulin-dependent diabetes mellitus: an epidemiological perspective." Autoimmunity **15**(1): 61-65.

Deschepper C. F. and Llamas B. (2007). "Hypertensive cardiac remodeling in males and females: from the bench to the bedside." Hypertension **49**(3): 401-407.

Dhalla N. S.; Liu X.; Panagia V. and Takeda N. (1998). "Subcellular remodeling and heart dysfunction in chronic diabetes." Cardiovasc Res **40**(2): 239-247.

Dias-Peixoto M. F.; [Santos R. A.](#); [Gomes E. R.](#); [Alves M. N.](#); [Almeida P. W.](#); [Greco L.](#); [Rosa M.](#); [Fauler B.](#); [Bader M.](#); [Alenina N.](#); [Guatimosim S.](#) (2008). "Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/ Mas signaling pathway in cardiomyocytes." Hypertension 52(3):542-8.

Ding A R. B. (2006). "Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy." Am J Physiol Heart Circ Heart Physiol 291(H1): 489-506.

Donoghue M.; Hsieh F.; Baronas E.; Godbout K.; Gosselin M.; Stagliano N.; Donovan M.; Woolf B.; Robison K.; Jeyaseelan R.; Breitbart R. E. and Acton S. (2000). "A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9." Circ Res 87(5): E1-9.

Dorman J. S.; Steenkiste A. R.; Foley T. P.; Strotmeyer E. S.; Burke J. P.; Kuller L. H. and Kwoh C. K. (2001). "Menopause in type 1 diabetic women: is it premature?" Diabetes 50(8): 1857-1862.

Fang Z.; Carlson S. H.; Chen Y. F.; Oparil S. and Wyss J. M. (2001). "Estrogen depletion induces NaCl-sensitive hypertension in female spontaneously hypertensive rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 281(6): R1934-1939.

Felaco M.; Grilli A.; De Lutiis M. A.; Patruno A.; Libertini N.; Taccardi A. A.; Di Napoli P.; Di Giulio C.; Barbacane R. and Conti P. (2001). "Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and localization in healthy and diabetic rat hearts." Ann Clin Lab Sci 31(2): 179-186.

Ferrario C. M.; Jessup J.; Chappell M. C.; Averill D. B.; Brosnihan K. B.; Tallant E. A.; Diz D. I. and Gallagher P. E. (2005). "Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2." Circulation 111(20): 2605-2610.

Ferrario C. M.; Trask A. J. and Jessup J. A. (2005). "Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(6): H2281-2290.

Ferreira A. J.; Bader M. and Santos R. A. (2012). "Therapeutic targeting of the angiotensin-converting enzyme 2/Angiotensin-(1-7)/Mas cascade in the renin-angiotensin system: a patent review." Expert Opin Ther Pat **22**(5): 567-574.

Fiordaliso F.; Leri A.; Cesselli D.; Limana F.; Safai B.; Nadal-Ginard B.; Anversa P. and Kajstura J. (2001). "Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death." Diabetes **50**(10): 2363-2375.

Fiordaliso F.; Li B.; Latini R.; Sonnenblick E. H.; Anversa P.; Leri A. and Kajstura J. (2000). "Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats in angiotensin II- dependent." Lab Invest **80**(4): 513-527.

Fjallskog M. L.; Janson E. T.; Falkmer U. G.; Vatn M. H.; Oberg K. E. and Eriksson B. K. (2008). "Treatment with combined streptozotocin and liposomal doxorubicin in metastatic endocrine pancreatic tumors." Neuroendocrinology **88**(1): 53-58.

Folkow B. (1982). "Physiological aspects of primary hypertension." Physiol Rev **62**(2): 347-504.

Freay A. D.; Curtis S. W.; Korach K. S. and Rubanyi G. M. (1997). "Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by estrogen in depolarized rat and mouse aorta. Role of nuclear estrogen receptor and Ca<sup>2+</sup> uptake." Circ Res **81**(2): 242-248.

Frustaci A.; Kajstura J.; Chimenti C.; Jakoniuk I.; Leri A.; Maseri A.; Nadal-Ginard B. and Anversa P. (2000). "Myocardial cell death in human diabetes." Circ Res **87**(12): 1123-1132.

Gabel S. A.; Walker V. R.; London R. E.; Steenbergen C.; Korach K. S. and Murphy E. (2005). "Estrogen receptor beta mediates gender differences in ischemia/reperfusion injury." J Mol Cell Cardiol **38**(2): 289-297.

Gorodeski G. I. (2002). "Update on cardiovascular disease in post-menopausal women." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **16**(3): 329-355.

Griendling K. K.; Sorescu D. and Ushio-Fukai M. (2000). "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." Circ Res **86**(5): 494-501.

Grohe C.; Kahlert S.; Lobbert K.; Stimpel M.; Karas R. H.; Vetter H. and Neyses L. (1997). "Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors." FEBS Lett **416**(1): 107-112.

Hanes D. S.; Weir M. R. and Sowers J. R. (1996). "Gender considerations in hypertension pathophysiology and treatment." Am J Med **101**(3A): 10S-21S.

Harman S. M. (2006). "Estrogen replacement in menopausal women: recent and current prospective studies, the WHI and the KEEPS." Gend Med **3**(4): 254-269.

Ingegno M. D.; Money S. R.; Thelmo W.; Greene G. L.; Davidian M.; Jaffe B. M. and Pertschuk L. P. (1988). "Progesterone receptors in the human heart and great vessels." Lab Invest **59**(3): 353-356.

Inoguchi T.; Li P.; Umeda F.; Yu H. Y.; Kakimoto M.; Imamura M.; Aoki T.; Etoh T.; Hashimoto T.; Naruse M.; Sano H.; Utsumi H. and Nawata H. (2000). "High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells." Diabetes **49**(11): 1939-1945.

Jazbutyte V.; Arias-Loza P. A.; Hu K.; Widder J.; Govindaraj V.; von Poser-Klein C.; Bauersachs J.; Fritzscheier K. H.; Hegele-Hartung C.; Neyses L.; Ertl G. and Pelzer T. (2008). "Ligand-dependent activation of ER{beta} lowers blood

pressure and attenuates cardiac hypertrophy in ovariectomized spontaneously hypertensive rats." Cardiovasc Res **77**(4): 774-781.

Jessup J. A.; Gallagher P. E.; Averill D. B.; Brosnihan K. B.; Tallant E. A.; Chappell M. C. and Ferrario C. M. (2006). "Effect of angiotensin II blockade on a new congenic model of hypertension derived from transgenic Ren-2 rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(5): H2166-2172.

Jessup J. A.; Lindsey S. H.; Wang H.; Chappell M. C. and Groban L. (2010). "Attenuation of salt-induced cardiac remodeling and diastolic dysfunction by the GPER agonist G-1 in female mRen2.Lewis rats." PLoS One **5**(11): e15433.

Jessup J. A.; Zhang L.; Chen A. F.; Presley T. D.; Kim-Shapiro D. B.; Chappell M. C.; Wang H. and Groban L. (2011). "Neuronal nitric oxide synthase inhibition improves diastolic function and reduces oxidative stress in ovariectomized mRen2.Lewis rats." Menopause **18**(6): 698-708.

Kajstura J.; Fiordaliso F.; Andreoli A. M.; Li B.; Chimenti S.; Medow M. S.; Limana F.; Nadal-Ginard B.; Leri A. and Anversa P. (2001). "IGF-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin II-mediated oxidative stress." Diabetes **50**(6): 1414-1424.

Kanaya A. M.; Herrington D.; Vittinghoff E.; Lin F.; Grady D.; Bittner V.; Cauley J. A. and Barrett-Connor E. (2003). "Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Ann Intern Med **138**(1): 1-9.

Kannel W. (1987). "Hypertension and other risk factors in coronary heart disease." American Heart Journal **114**(4): 918-925.

Kannel W. B.; Hjortland M. and Castelli W. P. (1974). "Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study." Am J Cardiol **34**(1): 29-34.

Kojda G. and Harrison D. (1999). "Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure." Cardiovasc Res **43**(3): 562-571.

Lacombe V. A.; Viatchenko-Karpinski S.; Terentyev D.; Sridhar A.; Emani S.; Bonagura J. D.; Feldman D. S.; Gyorke S. and Carnes C. A. (2007). "Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **293**(5): R1787-1797.

Landau D.; Chayat C.; Zucker N.; Golomb E.; Yagil C.; Yagil Y. and Segev Y. (2008). "Early blood pressure-independent cardiac changes in diabetic rats." J Endocrinol **197**(1): 75-83.

Lindsey S. H.; Cohen J. A.; Brosnihan K. B.; Gallagher P. E. and Chappell M. C. (2009). "Chronic treatment with the G protein-coupled receptor 30 agonist G-1 decreases blood pressure in ovariectomized mRen2.Lewis rats." Endocrinology **150**(8): 3753-3758.

Liu G. X.; Hanley P. J.; Ray J. and Daut J. (2001). "Long-chain acyl-coenzyme A esters and fatty acids directly link metabolism to K(ATP) channels in the heart." Circ Res **88**(9): 918-924.

Luczak E. D. and Leinwand L. A. (2009). "Sex-based cardiac physiology." Annu Rev Physiol **71**: 1-18.

Ma H.; Li S. Y.; Xu P.; Babcock S. A.; Dolence E. K.; Brownlee M.; Li J. and Ren J. (2009). "Advanced glycation endproduct (AGE) accumulation and AGE receptor (RAGE) up-regulation contribute to the onset of diabetic cardiomyopathy." J Cell Mol Med **13**(8B): 1751-1764.

Malfitano C D. A. K., Fernandes T, Wichi RB, Rosa K, Pazzino M, Mostarda C, Ronchi FA, Oliveira EM, Casarini DE, Irigoyen MC (2012). "Low-dose enalapril

reduces angiotensin II and attenuates diabetic-induced cardiac and autonomic dysfunctions." J Cardiovasc Pharmacol **59**(1): 58-65.

Maraschin Jde F M. N., Witter V, Silveiro SP (2010). "Diabetes Mellitus Classification." Arq Bras Cardiol. **95**(2):e40-6(2): e40-46.

Marcus R.; Krause L.; Weder A. B.; Dominguez-Meja A.; Schork N. J. and Julius S. (1994). "Sex-specific determinants of increased left ventricular mass in the Tecumseh Blood Pressure Study." Circulation **90**(2): 928-936.

Margolis K. L.; Bonds D. E.; Rodabough R. J.; Tinker L.; Phillips L. S.; Allen C.; Bassford T.; Burke G.; Torrens J. and Howard B. V. (2004). "Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial." Diabetologia **47**(7): 1175-1187.

Maric C. (2009). "Sex, diabetes and the kidney." Am J Physiol Renal Physiol **296**(4): F680-688.

Maric C. and Sullivan S. (2008). "Estrogens and the diabetic kidney." Gend Med **5 Suppl A**: S103-113.

Meininger C. J.; Marinos R. S.; Hatakeyama K.; Martinez-Zaguilan R.; Rojas J. D.; Kelly K. A. and Wu G. (2000). "Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency." Biochem J **349**(Pt 1): 353-356.

Mendelsohn M. E. and Karas R. H. (1999). "The protective effects of estrogen on the cardiovascular system." N Engl J Med **340**(23): 1801-1811.

Mendelsohn M. E. and Karas R. H. (2005). "Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences." Science **308**(5728): 1583-1587.

Miyazaki-Akita A.; Hayashi T.; Ding Q. F.; Shiraishi H.; Nomura T.; Hattori Y. and Iguchi A. (2007). "17beta-estradiol antagonizes the down-regulation of endothelial nitric-oxide synthase and GTP cyclohydrolase I by high glucose: relevance to postmenopausal diabetic cardiovascular disease." J Pharmacol Exp Ther **320**(2): 591-598.

Modesti A.; Bertolozzi I.; Gamberi T.; Marchetta M.; Lumachi C.; Coppo M.; Moroni F.; Toscano T.; Lucchese G.; Gensini G. F. and Modesti P. A. (2005). "Hyperglycemia activates JAK2 signaling pathway in human failing myocytes via angiotensin II-mediated oxidative stress." Diabetes **54**(2): 394-401.

Mohan P.; Brutsaert D. L. and Sys S. U. (1995). "Myocardial performance is modulated by interaction of cardiac endothelium derived nitric oxide and prostaglandins." Cardiovasc Res **29**(5): 637-640.

Mosca L.; Manson J. E.; Sutherland S. E.; Langer R. D.; Manolio T. and Barrett-Connor E. (1997). "Cardiovascular disease in women: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Writing Group." Circulation **96**(7): 2468-2482.

Murarka S. and Movahed M. R. (2010). "Diabetic cardiomyopathy." J Card Fail **16**(12): 971-979.

Murca T. M.; Moraes P. L.; Capurco C. A.; Santos S. H.; Melo M. B.; Santos R. A.; Shenoy V.; Katovich M. J.; Raizada M. K. and Ferreira A. J. (2012). "Oral administration of an angiotensin-converting enzyme 2 activator ameliorates diabetes-induced cardiac dysfunction." Regul Pept **177**(1-3): 107-115.

Nathan D. M. (1993). "Long-term complications of diabetes mellitus." N Engl J Med **328**(23): 1676-1685.

Neomoto O.; Kawaguchi M., Yaoita H.; Miyake K.; Maehara K.; Maruyama Y. (2006). "Left Ventricular Dysfunction and Remodeling in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats." Circ J **70**: 327 – 334.

Neves L. A.; Stovall K.; Joyner J.; Valdes G.; Gallagher P. E.; Ferrario C. M.; Merrill D. C. and Brosnihan K. B. (2008). "ACE2 and ANG-(1-7) in the rat uterus during early and late gestation." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **294**(1): R151-161.

O'Rahilly S. (1997). "Science, medicine, and the future. Non-insulin dependent diabetes mellitus: the gathering storm." BMJ **314**(7085): 955-959.

Okoshi K.; Guimaraes J. F.; Di Muzio B. P.; Fernandes A. A. and Okoshi M. P. (2007). "[Diabetic cardiomyopathy]." Arq Bras Endocrinol Metabol **51**(2): 160-167.

Ozdemir S.; Tandogan B.; Ulusu N. N. and Turan B. (2009). "Angiotensin II receptor blockage prevents diabetes-induced oxidative damage in rat heart." Folia Biol (Praha) **55**(1): 11-16.

Pathak M.; Sarkar S.; Vellaichamy E. and Sen S. (2001). "Role of myocytes in myocardial collagen production." Hypertension **37**(3): 833-840.

Peach M. J. (1977). "Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action." Physiol Rev **57**(2): 313-370.

Pendergrass K. D.; Pirro N. T.; Westwood B. M.; Ferrario C. M.; Brosnihan K. B. and Chappell M. C. (2008). "Sex differences in circulating and renal angiotensins of hypertensive mRen(2). Lewis but not normotensive Lewis rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(1): H10-20.

Pieper G. M. (1998). "Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes: protective role of arginine on endothelial dysfunction." Hypertension **31**(5): 1047-1060.

Pines A.; Fisman E. Z.; Levo Y.; Drory Y.; Ben-Ari E.; Motro M. and Ayalon D. (1993). "Menopause-induced changes in left ventricular wall thickness." Am J Cardiol **72**(2): 240-241.

Piro M.; Della Bona R.; Abbate A.; Biasucci L. M. and Crea F. (2010). "Sex-related differences in myocardial remodeling." J Am Coll Cardiol **55**(11): 1057-1065.

Poornima I. G.; Parikh P. and Shannon R. P. (2006). "Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis." Circ Res **98**(5): 596-605.

Prossnitz E. R.; Oprea T. I.; Sklar L. A. and Arterburn J. B. (2008). "The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor." J Steroid Biochem Mol Biol **109**(3-5): 350-353.

Ren J. (2000). "Attenuated cardiac contractile responsiveness to insulin-like growth factor I in ventricular myocytes from biobreeding spontaneous diabetic rats." Cardiovasc Res **46**(1): 162-171.

Ren J.; Duan J.; Thomas D. P.; Yang X.; Sreejayan N.; Sowers J. R.; Leri A.; Kajstura J.; Gao F. and Anversa P. (2008). "IGF-I alleviates diabetes-induced RhoA activation, eNOS uncoupling, and myocardial dysfunction." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **294**(3): R793-802.

Rhoden EL R. C., Lucas ML, Pereira-Lima L, Zettler C, Belló-Klein A (2002). "The role of nitric oxide pathway in the renal ischemia-reperfusion injury in rats." Transpl Immunol **10**(4): 277-284.

Ruggenenti P.; Cravedi P. and Remuzzi G. (2010). "The RAAS in the pathogenesis and treatment of diabetic nephropathy." Nat Rev Nephrol **6**(6): 319-330.

Sahn D. J.; DeMaria A.; Kisslo J. and Weyman A. (1978). "Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements." Circulation **58**(6): 1072-1083.

Salonia A.; Lanzi R.; Scavini M.; Pontillo M.; Gatti E.; Petrella G.; Licata G.; Nappi R. E.; Bosi E.; Briganti A.; Rigatti P. and Montorsi F. (2006). "Sexual

function and endocrine profile in fertile women with type 1 diabetes." Diabetes Care **29**(2): 312-316.

Santos R. A.; Campagnole-Santos M. J. and Andrade S. P. (2000). "Angiotensin-(1-7): an update." Regul Pept **91**(1-3): 45-62.

Santos R. A. and Ferreira A. J. (2007). "Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system." Curr Opin Nephrol Hypertens **16**(2): 122-128.

Santos R. A.; Ferreira A. J. and Simoes E. S. A. C. (2008). "Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis." Exp Physiol **93**(5): 519-527.

Santos R. A.; Simoes e Silva A. C.; Maric C.; Silva D. M.; Machado R. P.; de Buhr I.; Heringer-Walther S.; Pinheiro S. V.; Lopes M. T.; Bader M.; Mendes E. P.; Lemos V. S.; Campagnole-Santos M. J.; Schultheiss H. P.; Speth R. and Walther T. (2003). "Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8258-8263.

Savergnini S. Q.; Reis A. M.; Santos R. A.; Santos P. E.; Ferreira A. J. and Almeida A. P. (2012). "Effects of short-term administration of estradiol on reperfusion arrhythmias in rats of different ages." Braz J Med Biol Res **45**(12): 1248-1254.

Schaan B. D.; Silva A. M. and Irigoyen M. C. (2010). "[Endothelial dysfunction in diabetes mellitus and insulin resistance states: role of oxidative stress and potential therapeutic opportunities]." Arq Bras Endocrinol Metabol **54**(6): 514-515.

Schierbeck L. L.; Rejnmark L.; Tofteng C. L.; Stilgren L.; Eiken P.; Mosekilde L.; Kober L. and Jensen J. E. (2012). "Effect of hormone replacement therapy on cardiovascular events in recently postmenopausal women: randomised trial." BMJ **345**: e6409.

Schnedl W. J.; Ferber S.; Johnson J. H. and Newgard C. B. (1994). "STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells." Diabetes **43**(11): 1326-1333.

Shenoy V.; Grobe J. L.; Qi Y.; Ferreira A. J.; Fraga-Silva R. A.; Collamat G.; Bruce E. and Katovich M. J. (2009). "17beta-Estradiol modulates local cardiac renin-angiotensin system to prevent cardiac remodeling in the DOCA-salt model of hypertension in rats." Peptides **30**(12): 2309-2315.

Singal P.K.; Bello-Klein A.; Farahmand F.; Sandhawalia V. (2001). "Oxidative stress and functional deficit in diabetic cardiomyopathy." Adv Exp Med Biol **498**: 213-220.

Singh V. P.; Le B.; Khode R.; Baker K. M. and Kumar R. (2008). "Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis." Diabetes **57**(12): 3297-3306.

Soedamah-Muthu S. S.; Fuller J. H.; Mulnier H. E.; Raleigh V. S.; Lawrenson R. A. and Colhoun H. M. (2006). "All-cause mortality rates in patients with type 1 diabetes mellitus compared with a non-diabetic population from the UK general practice research database, 1992-1999." Diabetologia **49**(4): 660-666.

Solimene M. C. (2010). "Coronary heart disease in women: a challenge for the 21st century." Clinics (Sao Paulo) **65**(1): 99-106.

Sowers J. R. (1998). "Diabetes mellitus and cardiovascular disease in women." Arch Intern Med **158**(6): 617-621.

Stewart J. A., Jr.; Cashatt D. O.; Borck A. C.; Brown J. E. and Carver W. E. (2006). "17beta-estradiol modulation of angiotensin II-stimulated response in cardiac fibroblasts." J Mol Cell Cardiol **41**(1): 97-107.

Suarez J.; Scott B. and Dillmann W. H. (2008). "Conditional increase in SERCA2a protein is able to reverse contractile dysfunction and abnormal

calcium flux in established diabetic cardiomyopathy." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **295**(5): R1439-1445.

Taegtmeyer H M. P., Young ME (2002). "Adaptation and Maladaptation of the Heart in Diabetes: Part I : General Concepts." Circulation **105**: 1727-1733.

Tan K. C.; Chow W. S.; Ai V. H.; Metz C.; Bucala R. and Lam K. S. (2002). "Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes." Diabetes Care **25**(6): 1055-1059.

Tei L. L., Hodge D.O.; Bailey K. R.; Oh J. K.; Rodeheffer R. J.; Tajik A. J.; Seward J.B. (1995). "New index of combined systolic and diastolic myocardial performance: a simple and reproducible measure of cardiac function--a study in normals and dilated cardiomyopathy." J Cardiol **26**: 357-366.

Thomas P.; Pang Y.; Filardo E. J. and Dong J. (2005). "Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells." Endocrinology **146**(2): 624-632.

Tipnis S. R.; Hooper N. M.; Hyde R.; Karran E.; Christie G. and Turner A. J. (2000). "A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase." J Biol Chem **275**(43): 33238-33243.

Van Eickels M.; Grohe C.; Cleutjens J. P.; Janssen B. J.; Wellens H. J. and Doevendans P. A. (2001). "17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy." Circulation **104**(12): 1419-1423.

Wang F.; He Q.; Sun Y.; Dai X. and Yang X. P. (2010). "Female adult mouse cardiomyocytes are protected against oxidative stress." Hypertension **55**(5): 1172-1178.

Weatherman R. (2006). "Untangling the estrogen receptor web." Nat Chem Biol **2**(4): 175-176.

Weber K. T.; Brilla C. G. and Janicki J. S. (1993). "Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors." Cardiovasc Res **27**(3): 341-348.

Weber K. T.; Sun Y.; Tyagi S. C. and Cleutjens J. P. (1994). "Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms." J Mol Cell Cardiol **26**(3): 279-292.

Wells C. C.; Riazi S.; Mankhey R. W.; Bhatti F.; Ecelbarger C. and Maric C. (2005). "Diabetic nephropathy is associated with decreased circulating estradiol levels and imbalance in the expression of renal estrogen receptors." Gend Med **2**(4): 227-237.

Wenger N. K.; Speroff L. and Packard B. (1993). "Cardiovascular health and disease in women." N Engl J Med **329**(4): 247-256.

White R. E.; Gerrity R.; Barman S. A. and Han G. (2010). "Estrogen and oxidative stress: A novel mechanism that may increase the risk for cardiovascular disease in women." Steroids **75**(11): 788-793.

Wu Q.; Zhao Z.; Sun H.; Hao Y. L.; Yan C. D. and Gu S. L. (2008). "Oestrogen changed cardiomyocyte contraction and beta-adrenoceptor expression in rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion." Exp Physiol **93**(9): 1034-1043.

Xiang F. L.; Lu X.; Strutt B.; Hill D. J. and Feng Q. (2010). "NOX2 deficiency protects against streptozotocin-induced beta-cell destruction and development of diabetes in mice." Diabetes **59**(10): 2603-2611.

Yamaleyeva L. M.; Gilliam-Davis S.; Almeida I.; Brosnihan K. B.; Lindsey S. H. and Chappell M. C. (2012). "Differential regulation of circulating and renal ACE2 and ACE in hypertensive mRen2.Lewis rats with early-onset diabetes." Am J Physiol Renal Physiol **302**(11): F1374-1384.

Ye M.; Wysocki J.; Naaz P.; Salabat M. R.; LaPointe M. S. and Batlle D. (2004). "Increased ACE 2 and decreased ACE protein in renal tubules from diabetic mice: a renoprotective combination?" Hypertension **43**(5): 1120-1125.

Yin F. C.; Spurgeon H. A.; Weisfeldt M. L. and Lakatta E. G. (1980). "Mechanical properties of myocardium from hypertrophied rat hearts. A comparison between hypertrophy induced by senescence and by aortic banding." Circ Res **46**(2): 292-300.

Zhang D. X.; Fryer R. M.; Hsu A. K.; Zou A. P.; Gross G. J.; Campbell W. B. and Li P. L. (2001). "Production and metabolism of ceramide in normal and ischemic-reperfused myocardium of rats." Basic Res Cardiol **96**(3): 267-274.

Zhao X. Y.; Hu S. J.; Li J.; Mou Y.; Chen B. P. and Xia Q. (2006). "Decreased cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> -ATPase activity contributes to cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats." J Physiol Biochem **62**(1): 1-8.

Zicha J. and Kunes J. (1999). "Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat." Physiol Rev **79**(4): 1227-1282.

Ziolo M. T. and Bers D. M. (2003). "The real estate of NOS signaling: location, location, location." Circ Res **92**(12): 1279-1281.

Ziolo M. T.; Kohr M. J. and Wang H. (2008). "Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function." J Mol Cell Cardiol **45**(5): 625-632.

Zou MH C. R., Ullrich V. (2004). "Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus." Endothelium **11**(2): 89-97.

