

**Paula Lázara Cruz**

**Ação da piridostigmina na função cardíaca em modelo animal de  
Diabetes Mellitus tipo 2**

São Paulo

2025

**Paula Lázara Cruz**

**Ação da piridostigmina na função cardíaca em modelo animal de  
Diabetes Mellitus tipo 2**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título  
de Doutorado em Ciências

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cláudia Costa  
Irigoyen

São Paulo

2025

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cruz, Paula Lázara

Ação da piridostigmina na função cardíaca em modelo animal de Diabetes Mellitus tipo 2 / Paula Lázara Cruz; Maria Claudia Costa Irigoyen, orientador. -- São Paulo, 2025.

Tese (Doutorado) -- Programa de Cardiologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2025.

1.Brometo de piridostigmina 2.Diabetes Mellitus  
3.Disfunção autonômica 4.Frutose 5.Estreptozotocina  
I.Irigoyen, Maria Claudia Costa, orient. II.Título

USP/FM/DBD-252/25

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Folha de avaliação e Aprovação

**Nome:** CRUZ, Paula Lázara

**Título:** Ação da piridostigmina na função cardíaca em modelo animal de *Diabetes Mellitus* tipo 2

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciência.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Dedico esta tese a Nossa Senhora Aparecida por me acompanhar todos os dias da minha  
existência.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente a minha orientadora e mãe científica, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Cláudia Costa Irigoyen. Não tenho palavras para descrever a honra que eu tive em conviver e aprender com a Senhora. A minha admiração por ti ultrapassa a vida acadêmica. Obrigada por tudo.

Aos amigos do Laboratório de Hipertensão Experimental do Instituto do Coração. Passei por várias gerações e não quero cometer a indelicadeza de esquecer de alguém, então não citarei nomes. Agradeço a todos de coração por terem caminhado comigo, pelas risadas, pelas lágrimas, por tudo. Vocês são responsáveis pela minha formação como pessoa e não só pela formação acadêmica

Agradeço aos técnicos do Laboratório de Hipertensão Experimental, Maikon e Leandro. Obrigada pela ajuda, pela amizade de longa data, pelas conversas, risadas, lágrimas e conselhos. Vocês foram essenciais para a conclusão desta etapa da minha vida.

Ao Programa de Pós Graduação em Cardiologia, por todo o suporte, orientações e aconselhamentos, vocês são extremamente competentes e solícitos. Vocês não têm ideia do quanto isso facilita a vida do pós graduando.

Aos funcionários do Biotério da Divisão de Experimentação do Instituto do Coração, por toda a ajuda e orientações quanto ao manejo e cuidado com os animais. Em especial a veterinária Edna Paulo Diniz.

A todos os amigos da Divisão de Experimentação do Instituto do Coração, em especial ao Anderson pela ajuda, conversas e risadas que tivemos durante todos esses anos.

Agradeço duas pessoas super especiais, Cristiano Mostarda e Edson Dias Moreira, vocês não estão presentes no laboratório nos dias atuais, mas são lembrados constantemente pelo trabalho e pelo legado deixado a nós.

Agradeço demais a Ivana Cintia, Amanda Ribeiro, Alessandra Rogério, Jacqueline Freire Macchi, vocês me ajudaram muito em vários aspectos.

As queridas Prof<sup>a</sup> Katia de Angeli e Dr<sup>a</sup> Fernanda Consolim Colombo, por todas as colaborações e confiança, vocês são, juntamente com a Prof<sup>a</sup> Maria Cláudia, minha inspiração.

Aos alunos atuais do Laboratório de Hipertensão Experimental, Amanda Silva “Você é demais garota”, Alessandra, Manuela, Bruna, Danielle Dias e Bruno Nascimento vou me lembrar de vocês pra sempre.

Ao meu amigo, mais que amigo, não só científico, mas amigo de vida, amigo de coração Bruno Durante. Nós rimos juntos, choramos juntos, passamos por muita coisa e continuaremos assim pra sempre. Conte comigo para o que você precisar e a qualquer hora. Obrigada por tudo mesmo.

A banca examinadora, tanto da minha qualificação, quanto da defesa desta tese, por aceitarem e compartilharem comigo seu tempo e conhecimento.

A Cintia, Assis e William por serem pessoas tão especiais na minha vida, pelos momentos, pelo apoio, pelas palavras e pelas viagens, faremos muitas outras.

A minha família, que mesmo sem entender direito o que eu faço, tiveram a paciência de aguentar todo o processo, proferiram palavras de apoio, me deram inúmeros abraços e os olhares que diziam “Vai dar tudo certo”.

Esse trabalho só foi possível de ser realizado graças à ajuda de todos vocês, de forma direta e indireta. Um trabalho deste porte é impossível de ser realizado por uma pessoa. MUITÍSSIMO obrigada.

E por fim, agradeço a Deus e Nossa Senhora Aparecida, que nos momentos que não estavam segurando as minhas mãos, estavam me carregando no colo.

Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.

**Charles Darwin**

## RESUMO

CRUZ, P. L. **Ação da piridostigmina na função cardíaca em modelo animal de Diabetes Mellitus tipo 2.** 2025. Tese (Doutorado em Cardiologia – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2025).

O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares e, quando não controlado, promove alterações vasculares e autonômicas significativas. O consumo contínuo de frutose, presente na alimentação moderna, representa um agravante metabólico e um sério problema de saúde pública. Este projeto utilizou um modelo experimental em ratos que associa o uso de estreptozotocina (STZ) ao consumo de frutose, a fim de mimetizar com maior fidelidade as características clínicas do DM2 em humanos. A piridostigmina (PIR), um inibidor da acetilcolinesterase com uso clínico consolidado no tratamento de insuficiência cardíaca, arritmias ventriculares e infarto do miocárdio, foi investigada neste estudo devido à hipótese de que sua ação na via colinérgica anti-inflamatória poderia promover efeitos benéficos em parâmetros hemodinâmicos, metabólicos e inflamatórios associados ao DM2. A tese teve como objetivos estabelecer esse modelo combinado de DM2 e avaliar os efeitos do tratamento com PIR sobre a função cardíaca, alterações metabólicas e autonômicas, estresse oxidativo e fibrose cardíaca. Para isso, ratos Wistar machos foram divididos em seis grupos experimentais: controle (C), controle+frutose (CF), controle+piridostigmina (CFP), diabético (D), diabético+frutose (DF) e diabético+frutose+piridostigmina (DFP), com n=10 por grupo. Foram mensurados níveis séricos de glicose e triglicerídeos, realizado teste de resistência à insulina, avaliação da sensibilidade barorreflexa com drogas vasoativas, ecocardiografia de alta resolução, além de análises histológicas de colágeno e estresse oxidativo no tecido cardíaco. Os dados foram tratados estatisticamente por ANOVA seguida de pós-teste de Tukey, com significância definida em  $p < 0,05$ . O modelo experimental estabelecido com STZ e frutose reproduziu alterações típicas do DM2, como hiperglicemia, resistência à insulina, disfunções sistólica e diastólica, hipotensão arterial, desequilíbrio autonômico, alterações na frequência cardíaca e pressão arterial, além de agravamento do estresse oxidativo. O tratamento com piridostigmina, apesar de não prevenir a perda de massa corporal, restaurou o índice de Lee, melhorou os níveis de triglicerídeos, tolerância à insulina, parâmetros autonômicos, reduziu a deposição de colágeno e atenuou o estresse oxidativo. As análises de correlação revelaram que a variabilidade

da frequência (Var IP) se associou negativamente ao dano proteico cardíaco e à deposição de colágeno ventricular, enquanto a oxidação de proteínas correlacionou-se positivamente ao peróxido de hidrogênio, lipoperoxidação e massa ventricular. Os achados apontam que a piridostigmina tem potencial terapêutico na modulação autonômica e prevenção de complicações cardíacas no DM2, e que estudos adicionais são necessários para investigar melhor sua eficácia em diferentes doses e tempos de tratamento.

**Palavras chave:** Brometo de piridostigmina, Diabetes Mellitus, Disfunção autonômica, Frutose, Estreptozotocina.

## ABSTRACT

CRUZ, P. L. **Action of pyridostigmine on cardiac function in an animal model of type 2 Diabetes Mellitus**. 2025. Thesis (PhD in Cardiology – Medicine School, University of São Paulo, São Paulo, 2025).

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is one of the main risk factors for cardiovascular diseases and, when left uncontrolled, causes significant vascular and autonomic changes. Continuous consumption of fructose, present in the modern diet, represents a metabolic aggravation and a serious public health problem. This project used an experimental model in rats that associates the use of streptozotocin (STZ) with fructose consumption, in order to more faithfully mimic the clinical characteristics of DM2 in humans. Pyridostigmine (PYR), an acetylcholinesterase inhibitor with consolidated clinical use in the treatment of heart failure, ventricular arrhythmias and myocardial infarction, was investigated in this study due to the hypothesis that its action on the anti-inflammatory cholinergic pathway could promote beneficial effects on hemodynamic, metabolic and inflammatory parameters associated with DM2. The thesis aimed to establish this combined model of DM2 and evaluate the effects of treatment with PYR on cardiac function, metabolic and autonomic alterations, oxidative stress and cardiac fibrosis. For this purpose, male Wistar rats were divided into six experimental groups: control (C), control+fructose (CF), control+pyridostigmine (CFP), diabetic (D), diabetic+fructose (DF) and diabetic+fructose+pyridostigmine (DFP), with n=10 per group. Serum glucose and triglyceride levels were measured, insulin resistance testing was performed, baroreflex sensitivity was assessed with vasoactive drugs, high-resolution echocardiography was performed, and histological analyses of collagen and oxidative stress in cardiac tissue were performed. The data were statistically analyzed by ANOVA followed by Tukey's post-test, with significance set at  $p < 0.05$ . The experimental model established with STZ and fructose reproduced typical changes in DM2, such as hyperglycemia, insulin resistance, systolic and diastolic dysfunctions, arterial hypotension, autonomic imbalance, changes in heart rate and blood pressure, and worsening of oxidative stress. Pyridostigmine treatment, although not preventing body mass loss, restored the Lee index, improved triglyceride levels, insulin tolerance, autonomic parameters, reduced collagen deposition and attenuated oxidative stress. Correlation analyses revealed that heart rate variability (Var IP) was negatively associated with cardiac protein damage and ventricular collagen deposition, while protein oxidation was positively correlated with hydrogen peroxide, lipid peroxidation and ventricular mass. The findings indicate that pyridostigmine has

therapeutic potential in autonomic modulation and prevention of cardiac complications in T2DM, and that additional studies are needed to better investigate its efficacy at different doses and treatment times.

**Keywords:** Pyridostigmine bromide, Diabetes Mellitus, Autonomic dysfunction, Fructose, Streptozotocin.

## Sumário

### RESUMO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>01</b>
1.1 <i>Obesidade, Síndrome Metabólica e Diabetes mellitus tipo 2 &amp; Doenças cardiovasculares</i> .....	<b>02</b>
1.2 <i>Consumo excessivo de Frutose e alterações cardiometabólicas e autonômicas</i> .....	<b>07</b>
1.3 <i>Modelo Experimental de Diabetes e Síndrome Metabólica</i> .....	<b>08</b>
1.4 <i>Papel da via anti-inflamatória colinérgica nas alterações cardiometabólicas</i>	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1 <i>Objetivos específicos</i> .....	<b>14</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
3.1 <i>Animais</i> .....	<b>16</b>
3.2 <i>PROCEDIMENTOS E SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL</i> .....	<b>17</b>
3.3 <i>Administração da Frutose</i> .....	<b>18</b>
3.4 <i>Administração de estreptozotocina</i> .....	<b>18</b>
3.5 <i>Administração da piridostigmina</i> .....	<b>19</b>
3.6 <i>Monitoramento do peso corporal, dos níveis de glicose e triglicérides</i> .....	<b>20</b>
3.7 <i>Índice de massa corpórea (Índice de Lee)</i> .....	<b>20</b>
3.8 <i>Ecocardiografia</i> .....	<b>21</b>
3.9 <i>Cirurgia de canulação</i> .....	<b>22</b>
3.10 <i>Registros da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca de Repouso</i> .....	<b>23</b>
3.11 <i>Sensibilidade dos Pressorreceptores</i> .....	<b>24</b>
3.12 <i>Avaliação da modulação autonômica cardiovascular no domínio do tempo e da frequência (análise espectral)</i> .....	<b>25</b>

3.13 Avaliação de Resistência à Insulina (ITT) .....	26
3.14 Eutanásia e coleta de tecidos processamento do coração .....	26
3.15 Análise histológica .....	27
3.16 Análise quantitativa das fibras colagênicas .....	27
3.17 Avaliações de Estresse oxidativo .....	28
3.18 Análise Estatística .....	31
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
4.1 Validação do modelo de DM2 com Frutose+ STZ .....	33
4.1.1 Avaliações Metabólicas .....	33
4.1.1.1 Peso corporal .....	33
4.1.1.2 Índice de massa corpórea (Índice de Lee) .....	34
4.1.1.3 Glicemia e Triglicérides.....	35
4.1.1.4 Teste de tolerância à insulina (ITT) .....	38
4.2 Avaliações Ecocardiográficas .....	39
4.2.1 Morfometria cardíaca .....	39
4.2.2 Função cardíaca .....	41
4.3 Pressão Arterial e Frequência cardíaca .....	44
4.4 Sensibilidade barorreflexa .....	46
4.5 Análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) .....	47
4.6 Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica .....	48
4.7 Quantificação do colágeno em tecido cardíaco .....	50
4.8 Estresse oxidativo .....	52

<i>4.9 Efeitos da Piridostigmina no DM</i> .....	<b>56</b>
<i>4.9.1 Avaliações Metabólicas</i> .....	<b>56</b>
<i>4.9.1.1. Peso corporal</i> .....	<b>56</b>
<i>4.9.1.2 Índice de massa corpórea (Índice de Lee)</i> .....	<b>57</b>
<i>4.9.1.3 Glicemia e Triglicérides</i> .....	<b>58</b>
<i>4.9.1.4 Teste de tolerância à insulina (ITT)</i> .....	<b>60</b>
<i>4.9.2 Avaliações Ecocardiográficas</i> .....	<b>61</b>
<i>4.9.2.1 Morfometria cardíaca</i> .....	<b>61</b>
<i>4.9.2.2 Função cardíaca</i> .....	<b>63</b>
<i>4.9.3 Pressão Arterial e Frequência cardíaca</i> .....	<b>65</b>
<i>4.9.4 Sensibilidade barorreflexa</i> .....	<b>67</b>
<i>4.9.5 Análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC)</i> .....	<b>68</b>
<i>4.9.6 Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica</i> .....	<b>70</b>
<i>4.9.7 Quantificação do colágeno em tecido cardíaco</i> .....	<b>72</b>
<i>4.9.8 Estresse oxidativo</i> .....	<b>73</b>
<i>4.9.10 Estudo de correlação</i> .....	<b>79</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>80</b>
<i>5.1 Capítulo 1</i> .....	<b>82</b>
<i>5.2 Capítulo 2</i> .....	<b>92</b>
<i>5.3 Conclusões</i> .....	<b>102</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>104</b>

***INTRODUÇÃO***

---

---

## 1 INTRODUÇÃO

### *1.1 Obesidade, Síndrome Metabólica e Diabetes mellitus tipo 2 & Doenças cardiovasculares*

O Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, incluindo o Brasil como um dos países com alta prevalência. Considerando o DM2, sua prevalência global deverá chegar a 7.079 indivíduos por 100.000 habitantes até 2030, com aumento em todas as regiões. Entre as causas para o desenvolvimento do DM2 encontram-se fatores genéticos e ambientais como obesidade e estilo de vida (Kahn; Cooper; Del Prato, 2014). Adicionalmente o DM figura como um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares.

De fato, as evidências obtidas na literatura indicam que a obesidade, a síndrome metabólica e o Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) mantêm um elo de interações complexas entre fatores genéticos, ambientais e bioquímicos. Além da susceptibilidade genética, pode se estabelecer uma linha temporal adicional entre estas três condições que podem culminar no aparecimento do DM2, a qual apresentamos resumidamente a seguir. A obesidade seria a etapa inicial dessa linha temporal. De fato, a obesidade visceral (gordura intra-abdominal) é considerada o fator de risco mais importante para o desenvolvimento tanto da síndrome metabólica como do diabetes tipo 2. Este tecido adiposo visceral libera uma série de citocinas inflamatórias e adipocinas que constituem um estado inflamatório cronicado associado à resistência à insulina, o que, em última análise, pode levar à hiperglicemia compensatória (Kahn; Hull; Utzschneider, 2006).

Esta condição constitui um fator de risco significativo para o desenvolvimento da Síndrome Metabólica, a qual, no nosso espectro temporal, pode ser classificada como um estado intermediário para o desenvolvimento do DM 2. Efetivamente, o termo SM descreve um conjunto de fatores de risco que se manifestam num indivíduo e aumentam a probabilidade de desenvolver doenças cardiovasculares e DM. A Síndrome Metabólica (SM) é uma condição clínica caracterizada por uma combinação de fatores de risco, incluindo circunferência abdominal aumentada, pressão arterial (PA) elevada, aumento de triglicérides, redução do colesterol HDL e glicemia de jejum aumentada (Saklayen, 2018).

Num determinado momento temporal, a manifestação de resistência à insulina e outros fatores da SM pode aumentar significativamente o risco de desenvolvimento do DM2, o qual é caracterizado por hiperglicemia persistente resultante da disfunção das

células B pancreáticas, que se esgotam no processo de produção de hiperinsulinemia compensatória (Prentki, 2006).

Na sequência faremos uma breve revisão sobre estas três etapas, iniciando pela obesidade.

A obesidade é definida como uma condição crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo ou anormal de gordura corporal, o qual pode comprometer a saúde. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2024), o diagnóstico clínico é estabelecido com base num índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 30 kg/m<sup>2</sup>. Trata-se de uma doença multifatorial crônica, resultante da interação de fatores genéticos, sociais, culturais, nutricionais, metabólicos ou endócrinos (Freitas et al., 2014; Ribeiro et al., 2006).

Em 2022, segundo a Organização Mundial de Saúde (2024), o sobrepeso afetou 2,5 mil milhões de adultos com mais de 18 anos, dos quais 890 milhões apresentavam obesidade. A faixa etária com maior percentual de prevalência é a dos 50 aos 65 anos. Os continentes americano e europeu apresentam as maiores taxas de indivíduos com excesso de peso e obesidade, com um aumento na prevalência de, respetivamente, 15,6% e 11,6% entre 1980 e 2019 (Boutari; Mantzoros, 2022).

Um estudo brasileiro, realizado com 40 853 adultos, revelou que 52,5% dos participantes apresentam um índice de massa corporal superior ao recomendado e que 17,9% são obesos, o que confirma os dados apresentados pela OMS (Monteiro et al., 2016). A obesidade é considerada uma epidemia de âmbito mundial, afetando países desenvolvidos e em desenvolvimento. Esta condição está presente em todas as classes económicas, mas manifesta-se predominantemente em famílias de baixos rendimentos. Não obstante, e apesar de a obesidade afetar quase um oitavo da população mundial, não foi alcançado um consenso global sobre a classificação e definição da obesidade. Os indivíduos com obesidade apresentam diferentes perfis de saúde e necessidades, contudo, são frequentemente discutidos como uma entidade única, definida por um único parâmetro (IMC), ou não são objeto de qualquer discussão. Neste sentido, a Comissão Lancet de Diabetes e Endocrinologia propõe uma reavaliação dos paradigmas atuais sobre a obesidade. Ao fornecer uma nova definição e estrutura diagnóstica, esta Comissão identifica quando a obesidade é um fator de risco (obesidade pré-clínica) e quando representa uma doença isolada (obesidade clínica). A nova definição, fundamentada em evidências, distingue a "obesidade clínica", um estado de doença crônica e sistêmica diretamente causado pelo excesso de adiposidade, da "obesidade pré-clínica", uma

condição de excesso de adiposidade sem disfunção orgânica ou limitações nas atividades diárias, mas com risco aumentado para a saúde no futuro. Dada a limitação inerente ao IMC, a Comissão recorre a outras medidas antropométricas, tais como a circunferência da cintura, a relação cintura-quadril e a relação cintura-altura, complementando o IMC na definição do estado de obesidade. A implementação desta nova estrutura diagnóstica deverá facilitar um manejo mais acessível e eficaz da obesidade (Rubino et al., 2025).

Em virtude das diversas alterações metabólicas associadas aos novos padrões de vida, é plausível o desenvolvimento da síndrome metabólica (SM), sobretudo quando ocorre um acúmulo de adipócitos na região abdominal. Conforme a definição da Organização Mundial de Saúde (OMS), a Síndrome Metabólica (SM) constitui um distúrbio metabólico complexo, caracterizado pela associação de intolerância à glicose e/ou resistência à insulina, bem como dois ou mais dos seguintes fatores: Aumento da pressão arterial sistêmica (valores superiores a 140/90 mmHg); adiposidade central/abdominal e ou índice de massa corporal (IMC) maior que 30 kg/m<sup>2</sup>; microalbuminúria (maior ou igual a 20 µg/min ou a razão albumina/creatinina maior ou igual a 30 mg/g). A hipertrigliceridemia, definida como concentrações plasmáticas superiores a 150 mg/dL, e a diminuição das concentrações séricas de lipoproteína de alta densidade (HDL-C) abaixo dos 35 mg/dL e 39 mg/dL em homens e mulheres, respectivamente ((Khosravi-Boroujeni et al., 2015; World Health Organization, 1999)), constituem a manifestação clínica da doença. Dessa forma, a definição da síndrome metabólica pela Organização Mundial de Saúde (OMS) foi estabelecida em 1998, tendo-se mantido como referência internacional. Embora outras organizações, como a Federação Internacional de Diabetes (IDF) e o NCEP-ATP III, tenham proposto critérios alternativos, a OMS não publicou uma atualização oficial dessa definição até o momento.

A SM constitui um fator preditivo relevante para o desenvolvimento de diabetes mellitus (DM), uma vez que nos indivíduos com SM os riscos são cinco vezes superiores em comparação com a população saudável. A nível mundial, o DM é uma doença crônica que afeta 537 milhões de pessoas. Segundo a IDF (2021), projeta-se que este número ultrapasse 783 milhões de indivíduos em 2045 (International Diabetes Federation, 2021).

O Diabetes Mellitus (DM) é uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada principalmente pela presença de hiperglicemia persistente. Esta condição resulta de uma absorção inadequada de glicose, associada a deficiências na secreção de insulina, ausência total desse hormônio e/ou à incapacidade da insulina de exercer adequadamente os seus efeitos. Esse quadro promove o desenvolvimento de resistência à

insulina, seguido pela falência das células  $\beta$  pancreáticas, que se tornam incapazes de compensar a resistência periférica. Consequentemente, as células são incapacitadas de desempenhar adequadamente suas funções vitais (Martín-Timón, 2014).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2024), o diagnóstico é realizado com base em critérios específicos, sendo que a satisfação de apenas um destes critérios é suficiente para o seu estabelecimento. A glicemia de jejum deve ser igual ou superior a 126 mg/dL (7,0 mmol/L). A glicemia deve ser igual ou superior a 200 mg/dL (11,1 mmol/L) duas horas após a administração de 75 g de glicose por via oral. A hemoglobina glicada (HbA1c) deve ser igual ou superior a 6,5%. A glicemia casual deve ser igual ou superior a 200 mg/dL em pacientes com sintomas clássicos. O DM é um grupo de perturbações metabólicas do metabolismo de carboidratos, nas quais a glicose é subutilizada como fonte de energia e produzida em excesso devido a uma glicogênese e uma glicogenólise inadequadas, resultando em hiperglicemia. O DM pode ser diagnosticado com base na demonstração de concentrações elevadas de glicose no plasma venoso ou aumento da hemoglobina glicada no sangue. A classificação convencional do DM abrange várias categorias clínicas, tais como o DM tipo 1 ou 2, o DM gestacional e outros tipos específicos derivados de outras causas, incluindo causas genéticas, distúrbios pancreáticos exócrinos e medicamentos (ElSayed et al., 2025).

O DM2 é o tipo mais prevalente, representando 90% dos casos diagnosticados. É importante salientar que cerca de 50% dos indivíduos afetados não estão cientes da sua condição, precisamente devido à natureza assintomática inicial da doença e à ausência de necessidade de terapia com insulina (Lin; Sun, 2010). Num primeiro momento, a patologia é assintomática, sendo que as complicações associadas podem demorar um período de três a cinco anos até serem evidentes (Lin; Sun, 2010; Olokoba; Obateru; Olokoba, 2012).

Atualmente, o diabetes afeta 10,5% da população adulta mundial. O Brasil ocupa a quinta posição, com um total de 15,7 milhões de casos. As estimativas atuais indicam que, até 2035, o número de indivíduos afetados pela doença na América Latina atingirá os 38,5 milhões, representando um aumento significativo em comparação com os 24,1 milhões registrados atualmente. Este aumento representa uma proporção considerável da população adulta da região, estimada em cerca de 9%. É importante salientar que, em 46% dos casos, os pacientes não estão cientes da sua condição, o que sugere a necessidade de estratégias de rastreio e conscientização para promover o diagnóstico precoce e a implementação de tratamentos adequados (International Diabetes Federation, 2021).

O aumento substancial da prevalência da obesidade tem desencadeado um incremento nos casos de diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Este cenário é motivo de apreensão, dada a sua associação com elevados índices de morbidade e mortalidade, resultantes das complicações associadas a esta condição. De acordo com o Atlas de Diabetes da Federação Internacional de Diabetes (IDF) de 2025, estima-se que, em 2024, cerca de 589 milhões de adultos (com idades entre os 20 e os 79 anos) viviam com diabetes, número que poderá atingir os 853 milhões até 2050, caso não sejam implementadas outras medidas efetivas. Este aumento é atribuído a fatores como a urbanização acelerada, o envelhecimento populacional, a redução da atividade física e o aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade. Adicionalmente, mais de 40% dos adultos com diabetes não estão cientes da sua condição, o que exacerba o risco de complicações como doenças cardiovasculares, insuficiência renal e retinopatia. No Brasil, a situação é igualmente alarmante. Dados recentes apontam para o fato de que cerca de 20 milhões de cidadãos brasileiros vivem com diabetes, posicionando o país entre os que apresentam um número mais elevado de casos a nível mundial. A prevalência é particularmente elevada no sexo feminino, com 11,1% de casos, em comparação com 9,1% no sexo masculino (International Diabetes Federation, 2021).

O DM figura como um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares. Pacientes diabéticos podem desenvolver insuficiência cardíaca na ausência de hipertensão e de doença coronariana. As alterações que envolvem a estrutura e a função do músculo cardíaco são denominadas cardiomiopatia diabética. A doença se inicia com uma disfunção diastólica, que pode progredir para uma disfunção sistólica. Essa disfunção sistólica tem sido associada à piora do prognóstico (Boudina; Abel, 2007; Strunz et al., 2025).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o diabetes está associado tanto a complicações agudas, como a cetoacidose diabética, que ocorre em situações de extrema deficiência da ação insulínica, quanto a complicações tardias, que acometem diversos órgãos e sistemas, incluindo olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. Essas complicações crônicas frequentemente resultam em incapacitação permanente ou invalidez. As complicações crônicas do diabetes podem ser classificadas em dois grupos principais: 1- Doenças microvasculares, que provocam danos aos pequenos vasos sanguíneos, sendo representadas principalmente pela retinopatia, nefropatia e neuropatia diabética. 2- Doenças macrovasculares, que incluem a aterosclerose, a doença arterial

periférica, a doença carotídea e a doença arterial coronariana. (ElSayed et al., 2025; Strunz et al., 2025; Van de Weijer; Schrauwen-Hinderling; Schrauwen, 2011).

Em casos de ausência de controle, o DM2 pode resultar em uma série de alterações, incluindo as vasculares e as autonômicas. Conseqüentemente, pacientes diabéticos apresentam maior vulnerabilidade ao desenvolvimento de eventos cardiovasculares adversos, tais como infartos e acidentes vasculares cerebrais. Diferentes mecanismos, dentre eles a hiperglicemia e a disfunção autonômica, são apontadas como causas das referidas dificuldades (Barboza et al., 2019; Martín-Timón, 2014).

Apesar da predisposição genética, outros fatores, tais como o envelhecimento, a qualidade da dieta, o sedentarismo e o estilo de vida, são elementos que contribuem para o desenvolvimento de DM2, SM e obesidade (Monteiro et al., 2016; Rivera et al., 2014).

### ***1.2 Consumo excessivo de Frutose e alterações cardiometabólicas e autonômicas***

Nas últimas décadas houve um aumento significativo no consumo de frutose, possivelmente pelo seu uso na alimentação como forma de adoçar os alimentos e bebidas processadas (Dupas et al., 2017; Ogden et al., 2011; Vos et al., 2008). Nas últimas décadas, o consumo de frutose aumentou significativamente, principalmente devido à ampla utilização do xarope de milho com alto teor de frutose (HFCS) como adoçante em alimentos e bebidas processadas. A frutose é um monossacarídeo presente naturalmente nos alimentos como o mel, frutas e alguns vegetais. Sua fórmula molecular é semelhante à da glicose, porém as duas diferem estruturalmente através do processo de isomerização, tendo como produto final o xarope de milho de alta frutose, também conhecido como HFCS (do inglês: *High fructose corn syrup*), sendo considerados açúcares mais doces que a sacarose (Henry; Crapo; Thorburn, 1991; Sloboda et al., 2014). Sendo assim, o uso da frutose pela indústria alimentícia tem aumentado anualmente, pois a quantidade de frutose necessária para adoçar os alimentos é menor quando comparada com a quantidade de sacarose, tornando-se uma substância lucrativa para as empresas alimentícias (Hanover; White, 1993; Kay Parker; Michelle Salas; Veronica C. Nwosu, 2010; Sloboda et al., 2014).

Do ponto de vista bioquímico o consumo crônico de frutose traz conseqüências potencialmente negativas na função metabólica geral, favorecendo o desenvolvimento de um quadro de SM e possível desenvolvimento de DM (Sloboda et al., 2014).

Estudos realizados em ratos demonstram que a sobrecarga de frutose favorece o surgimento de hipertensão, resistência à insulina, hipertrigliceridemia, ganho de peso,

formação de ácido úrico, ativação do sistema renina-angiotensina, inflamação, resistência a leptina, intolerância à glicose e ao favorecimento para o aparecimento do quadro de SM (Farah et al., 2006; Jürgens et al., 2005; Kelley; Allan; Azhar, 2004; Nakagawa et al., 2005; Shapiro et al., 2008; Tran; Yuen; McNeill, 2009; Zou et al., 2012).

Nosso grupo demonstrou que o consumo crônico de frutose em ratos Wistar, machos e fêmeas, é o causador de várias alterações metabólicas e estruturais no músculo cardíaco. Que este consumo também leva a resistência à insulina, aumento da pressão arterial (PA) e da sua variabilidade, redução do tônus vagal, disfunção autonômica, aumento da frequência cardíaca, mudanças na morfometria ventricular esquerda, disfunção diastólica, estresse oxidativo vascular, aumento do esforço cardíaco e aumento dos parâmetros inflamatórios (Angelis et al., 2012; Brito et al., 2008; Conti et al., 2014; Lehnen et al., 2013).

A sensibilidade barorreflexa e a variabilidade da frequência cardíaca são consideradas excelentes marcadores de função autonômica e a redução destes parâmetros tem sido associada à maior morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares (Dekker et al., 1997; La Rovere, 1998; Tsuji et al., 1994), sugerindo que intervenções capazes de interferir nesses parâmetros possam ser consideradas no manejo das diversas afecções cardiometabólicas. De fato, trabalho recente de nosso grupo mostrou que o tratamento com a galantamina, inibidor da acetilcolinesterase, melhorou significativamente a modulação autonômica cardiovascular, o que foi associado à melhora da disfunção cardiometabólica em filhos de pais expostos ao consumo crônico de frutose (De Miranda et al., 2024).

### ***1.3 Modelo Experimental de Diabetes e Síndrome Metabólica***

O consumo contínuo de frutose em ratos, induz um modelo com características clínicas semelhantes às que ocorrem com humanos consumidores de altas doses diárias de açúcares como: ganho de peso, resistência à insulina, hipertrigliceridemia, inflamação crônica, intolerância à glicose, e um quadro semelhante ao da SM (Zou et al., 2012).

Na busca pelo desenvolvimento de um modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), foi utilizada a administração de estreptozotocina (STZ) em baixa dose (40 mg/kg). Embora seja um agente conhecidamente indutor de diabetes quando administrado em doses mais elevadas (50–60 mg/kg), o uso da baixa dosagem visa mimetizar as características metabólicas do DM2, especialmente quando associado ao consumo de frutose. A estreptozotocina é um agente quimioterápico empregado no tratamento de

tumores carcinoides e endócrinos do pâncreas. Sua ação ocorre por meio da inibição da adenina-nicotinamida nas células  $\beta$ -pancreáticas, levando à inibição da síntese de DNA. Esse processo resulta no bloqueio irreversível da produção de insulina, causando hiperglicemia grave e, conseqüentemente, promovendo o desenvolvimento do diabetes em modelos animais, de forma semelhante ao DM tipo 1 em humanos (Masiello et al., 1998). Ratos diabéticos induzidos por STZ e não tratados com insulina apresentam um conjunto de alterações metabólicas e fisiológicas semelhantes às observadas em seres humanos, tais como: hiperglicemia, polidipsia, poliúria, perda de peso, polifagia, cardiomiopatia e neuropatia diabética (Junod et al., 1969). O comprometimento do sistema nervoso autônomo nesses animais pode ocasionar diversas alterações funcionais, especialmente no sistema cardiovascular (De Angelis et al., 2002). Entre as manifestações típicas observadas nesses modelos estão: bradicardia após a administração de STZ, redução da pressão arterial (PA), diminuição da variabilidade da frequência cardíaca (FC), além de alterações na frequência cardíaca intrínseca, no tônus vagal e no controle reflexo cardiovascular — incluindo o barorreflexo e o quimiorreflexo (De Angelis et al., 2002; Farah; Elased; Morris, 2007). Essas alterações funcionais podem ainda estar associadas a modificações estruturais desfavoráveis no tecido cardíaco e a disfunções na função ventricular, frequentemente observadas em ratos diabéticos (De Angelis et al., 2000).

Por muitos anos nosso grupo tem trabalhado com este modelo de indução por STZ mas com as limitações que o mesmo apresenta. Apesar de produzir um quadro de hiperglicemia e outras características do Diabete mellitus, a deficiência grande de insulina aproxima o quadro do diabetes tipo 1, inviabilizando estudos cujos interesse sejam os da fisiopatologia do diabetes tipo 2.

A literatura é rica em evidências dos efeitos da frutose e da STZ isoladamente, como forma de induzir modelos de DM e SM em ratos (Brito et al., 2008; Conti et al., 2014). Entretanto, modelos de DM2 através da associação de frutose e STZ, são mais raros na literatura, mas seu uso pode proporcionar um modelo mais próximo do DM2 em humanos e com o desenvolvimento das principais características da doença em ratos (Barrière et al., 2018).

#### ***1.4 Papel da via anti-inflamatória colinérgica nas alterações cardiometabólicas***

Estudos mostram que o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) em geral e particularmente o parassimpático pode interagir com o Sistema Imunológico (SI). A modulação das respostas inflamatórias por meio do ramo parassimpático do SNA é denominada “via anti-inflamatória colinérgica” (Huston; Tracey, 2011; Wang et al., 2004). Esta associação ocorre quando o nervo vago é estimulado liberando acetilcolina e na sequência envolvendo várias vias inclusive adrenérgicas, até alcançar a subunidade  $\alpha$ -7 do receptor nicotínico dos macrófagos e linfócitos T (De La Fuente et al., 2013; Swirski et al., 2006). De fato, artigo mais recente revisou a literatura sobre a modulação vagal da inflamação cujas evidências tem como base o campo da neuroimunologia e seu domínio correlato, a psiconeuroimunologia (Alen, 2022).

Diversas vias neurobiológicas estão envolvidas na modulação e inibição da inflamação excessiva pelo nervo vago. Em primeiro lugar, os paragânglios vagais expressam receptores para a interleucina-1 uma importante citocina inflamatória que pode desempenhar um papel crucial na progressão do DM2 (Zhao et al., 2014).

Nestas condições várias rotas anti-inflamatórias são ativadas para controlar a inflamação periférica. A primeira delas é uma rota neuro-hormonal central, incluindo o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Isso ocorre após a conversão vagal aferente do sinal periférico de IL-1 em acetilcolina, que então ativa o hipotálamo. Isso aciona o eixo HPA para secretar cortisol, que causa efeito anti-inflamatório (Pavlov; Tracey, 2005).

A segunda rota é uma via neuro imunológica eferente, na qual as fibras vagais eferentes alcançam o gânglio celíaco e se convertem em um ramo simpático que inerva o baço. No baço um subgrupo de células T colinérgica foi identificado (Satapathy et al., 2011).

Essas células T especiais, assim como outras células T, expressam receptores beta adrenérgicos para receber a sinalização simpática. Uma vez que o receptor beta adrenérgico dessas células T colinérgicas é sinalizado, elas produzem o neurotransmissor vagal acetilcolina (Ach), que então atinge seu receptor alfa-7 nicotínico de Ach nos macrófagos esplênicos. Essa sinalização dos macrófagos resulta, em última análise, na síntese reduzida de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, podem existir vias adicionais, por meio das quais o nervo vago modula a inflamação, que inclui possível inervação direta do baço pelo vago, estimulação vagal de segmentos intestinais e estimulação vagal da glândula adrenal, resultando na secreção de dopamina (Bassi et al., 2020).

Pode se promover o aumento da atividade dos nervos colinérgicos por diferentes vias: com a estimulação elétrica, com o uso de agonistas colinérgicos, ou ainda, com o aumento da atividade da acetilcolina. Todos esses mecanismos têm como resultado um efeito imunossupressor por meio da inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias. Tais complicações foram descritas em modelos de sepse (Tracey, 2002, 2007; Wang et al., 2004), inflamação asséptica e infarto do miocárdio, na qual verificou-se a participação do SNA sobre o remodelamento cardíaco (Guarini et al., 2003; Rocha et al., 2016; RUTGEERTS; VAN ASSCHE; VERMEIRE, 2006).

O brometo de piridostigmina (PIR) é um anticolinesterásico reversível com ação periférica. Devido à lipofobicidade da molécula, esta não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. O composto é capaz de impedir a hidrólise da acetilcolina pela colinesterase, aumentando a biodisponibilidade deste neuro mediador na fenda sináptica (Androne, 2003). Além da grande experiência no uso desta droga na miastenia gravis e na profilaxia da intoxicação por gases organofosforados este composto vem sendo bastante empregado na falência cardíaca, nas arritmias ventriculares e no infarto do miocárdio (Barboza et al., 2019; Behling et al., 2003; Castro et al., 2002; Volans, 1996). Em ratos infartados tratados com PIR houve uma melhora na sensibilidade do barorreflexo, aumento da modulação vagal e redução do tônus simpático regulando o balanço simpatovagal (Barboza et al., 2019; Behling et al., 2003; Lataro et al., 2013; Levy, 1989).

Atualmente, há um crescente interesse no papel da desregulação autonômica na origem da SM e obesidade (Winzell; Ahrén, 2004). Durante a desregulação ocorre atenuação da atividade parassimpática, fator este determinante para o desenvolvimento de resistência a insulina. Desta maneira, o desbalanço autonômico pode ser o mecanismo chave para o entendimento dos processos metabólicos e cardiovasculares associados com as doenças cardiometabólicas (Bernardes et al., 2018; Satapathy et al., 2011). Até o momento há poucos dados quanto à utilização e ação da PIR na disfunção metabólica. Por isso propomos estimular a via anti-inflamatória colinérgica com o uso da PIR e verificar se ocorre melhora do perfil hemodinâmico, autonômico e metabólico em modelo experimental de DM2 com o consumo de frutose associado à administração de estreptozotocina. Desta forma, nesta tese testamos a hipótese que em modelo experimental de DM2, o tratamento com PIR é capaz de atenuar os efeitos cardiometabólicos promovidos pela indução da doença em ratos (frutose+estreptozotocina). Essa proteção induzida pela PIR pode estar associada a

melhora da modulação autonômica cardiovascular e redução do estresse oxidativo e da deposição de colágeno associada ao DM2, impactando na estrutura e função cardíacas.

***OBJETIVOS***

---

---

## **2 OBJETIVOS**

Estabelecer e caracterizar um modelo experimental de DM2, induzido pelo consumo crônico de frutose e administração de estreptozotocina. Analisar o efeito da estimulação colinérgica, por meio do tratamento com piridostigmina, nesse modelo de DM2 sobre parâmetros cardiometabólicos e autonômicos.

### **2.1 Objetivos específicos**

Estabelecer um modelo experimental de DM2 em ratos, induzido pelo consumo crônico de frutose associado à administração de estreptozotocina, avaliando e comparando com ratos submetidos ao consumo de frutose ou administração de estreptozotocina de forma isolada com relação a parâmetros metabólicos, hemodinâmicos, de controle e modulação autonômica cardiovascular e de estrutura, função, fibrose e estresse oxidativo cardíaco.

Avaliar os efeitos do tratamento com piridostigmina em modelo experimental de DM2 sobre parâmetros:

- metabólicos: peso corporal, glicemia, triglicérides, e resistência à insulina;
- hemodinâmicas e autonômicas: pressão arterial, frequência cardíaca, variabilidade da FC e PA e sensibilidade dos pressorreceptores;
- de estrutura e função cardíaca (morfometria, função sistólica e diastólica por meio da avaliação pelo ecocardiograma);
- de estresse oxidativo cardíaco por meio de avaliação de pró-oxidantes, antioxidantes e dano oxidativo;
- de deposição de colágeno fibrilar no miocárdio.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi realizado em conformidade com os procedimentos ARRIVE para experimento animal (Kilkenny et al., 2010) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) conforme o parecer nº 1282/2019.

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) variedade Wistar machos, de oito semanas, pesando entre 250g e 300g, provenientes do centro de bioterismo do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB/USP) e alocados no Biotério da Divisão de Experimentação do Instituto do Coração (InCor / HC-FMUSP), em ambiente com temperatura controlada (22°C – 24°C) e ciclo de 12 horas claro/escuro.

A acomodação foi de até quatro animais por caixa no período de treze semanas; após os procedimentos cirúrgicos os ratos foram mantidos em caixas individuais, totalizando quinze semanas de estudo.

Foi oferecida ração comercial normoproteica (12% de proteínas) de modo irrestrito. Água também foi oferecida de modo irrestrito, porém nos grupos tratados com frutose, esta foi diluída na água.

Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos (n=10/grupo):

- Grupo **Controle** (C) - composto por oito animais normais sem consumo de frutose e sem tratamento;
- Grupo **Controle + Frutose** (CF) – composto por oito animais normais e submetidos ao consumo de frutose;
- Grupo **Controle + Frutose + Piridostigmina** (CFP) – composto por oito animais normais e submetidos ao consumo de frutose e administração de piridostigmina;
- Grupo **Diabetes** (D) – composto por oito animais tratados com estreptozotocina sem consumo de frutose;
- Grupo **Diabetes + Frutose** (DF) – composto por oito animais tratados com estreptozotocina e submetidos ao consumo de frutose;

– Grupo **Diabetes + Frutose + Piridostigmina** (DFP) – composto por oito animais tratados com estreptozotocina, submetidos ao consumo de frutose e administração de piridostigmina.

O número de animais em cada grupo justificou-se pela experiência prévia de nosso grupo, que alcançou diferenças estatísticas com número amostral de oito a dez animais por grupo.

### ***3.2 PROCEDIMENTOS E SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL***

Os animais dos grupos CF, CFP, DF e DFP foram submetidos a ingesta de frutose na concentração de 10% na água de beber diariamente durante toda a duração do protocolo.

Os animais dos grupos DF e DFP, após oito semana de ingesta de frutose 10% receberam injeção de 40 mg estreptozotocina na veia caudal. Foram considerados diabéticos os ratos com glicemia em jejum igual ou superior a 200mg/dL na décima primeira semana.

Os animais dos grupos CFP e DFP receberam através de gavagem oral 40mg/kg/dia de piridostigmina diariamente, a partir da décima primeira semana de protocolo

Os animais dos grupos C e D receberam apenas água sem adição de frutose.

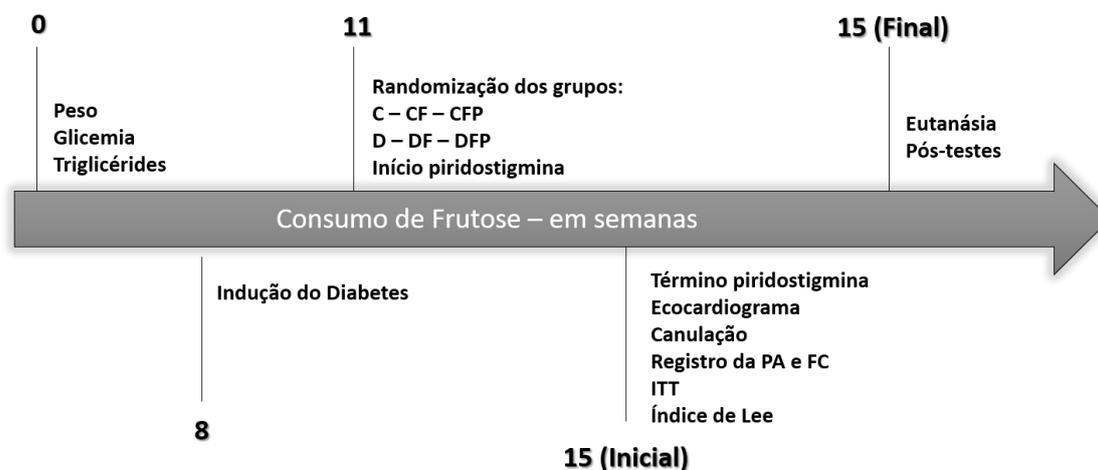
Os animais dos grupos D receberam a injeção de 50mg de estreptozotocina na veia caudal e foram considerados diabéticos os ratos com glicemia em jejum igual ou superior a 200mg/dL, após 14 dias.

As avaliações metabólicas foram analisadas nas semanas: 0, 9, 11 e 15.

No início da 15 semana todos os animais foram submetidos a avaliação ecocardiográfica seguida da cirurgia de canulação da veia e artéria femoral e após 24 horas foi realizado o registro das variáveis hemodinâmicas.

Ao final do protocolo (na 15ª semana) foi realizada a eutanásia e coleta de materiais para posteriores análises.

A sequência experimental do protocolo pode ser observada na Figura 01.



**Figura 01.** Sequência experimental. Os tempos 0, 8, 11 e 15 representam semanas de protocolo.

### 3.3 Administração da Frutose

A sobrecarga de frutose foi realizada a 10% na água de beber (D-frutose, 100g/L, Synth, São Paulo). Os animais dos grupos CF, CFP, DF e DFP consumiram frutose durante todo o período do protocolo (15 semanas). A administração posterior (8ª semana) da STZ nos animais constituiu os grupos DF e DFP.

### 3.4 Administração de estreptozotocina

Para a indução do diabetes nos animais, previamente tratados com frutose (DF e DFP), foram mantidos em jejum por 6 horas. O gás isoflurano foi utilizado como anestésico na concentração de 5% e mantido a 2,5% (Cristalia, São Paulo). Através da veia caudal, os animais receberam uma única injeção de 40mg/Kg de STZ dissolvida em tampão citrato 0,01 M, pH 4,5 (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA).

Para a indução do DM no grupo D (modelo clássico do DM), os animais foram mantidos em jejum por 6 horas. O gás isoflurano foi utilizado como anestésico na concentração de 5% e mantido a 2,5% (Cristalia, São Paulo). Através da veia caudal, os animais receberam uma única injeção de 50mg/Kg de STZ dissolvida em tampão citrato 0,01 M, pH 4,5 (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA).

Os animais dos grupos controles (C, CF e CFP) receberam somente a injeção do tampão citrato. Foram considerados diabéticos os ratos com glicemia em jejum igual ou superior a 200mg/dL (Figura 1).



**Figura 02.** Procedimento de injeção caudal da solução de estreptozotocina em ratos.

### ***3.5 Administração da piridostigmina***

A piridostigmina foi administrada nos grupos CFP e DFP, por procedimento de gavagem na dose de 40mg/kg/dia durante 21dias, a partir da semana 11 de consumo de frutose (Figura 2) (Soares et al., 2004).



**Figura 03.** Fotografia ilustrativa da administração da piridostigmina por gavagem.

### 3.6 Monitoramento do peso corporal, dos níveis de glicose e triglicérides

O peso dos animais foi aferido semanalmente. A avaliação da glicemia e dos triglicérides foram realizadas no início, após a indução do DM (semana 11) e ao final do protocolo (semana 15), utilizando-se de dispositivos portáteis (Accu-Chek e Accutrend GTC (Roche, IN, EUA)). Os animais foram submetidos a 4 horas de jejum, e retirada uma gota de sangue da veia caudal para cada medida (D'Avila et al., 1999; De Angelis et al., 2000; Maeda et al., 1995; Souza et al., 2007) (Figura 3).



**Figura 04.** Ilustração dos aparelhos portáteis utilizados para as análises das concentrações plasmáticas de triglicérides e glicose.

### 3.7 Índice de massa corpórea (Índice de Lee)

Os animais foram pesados e após a anestesia para o ecocardiograma o comprimento naso-anal (CNA) foi medido. A partir destes dados, foi calculado o índice de massa corpórea (Índice de Lee) de cada animal. O resultado é obtido pela razão da raiz cúbica do peso corporal (em gramas) sobre o CNA (em centímetros) (Novelli et al., 2007).

### **3.8 Ecocardiografia**

A ecocardiografia de alta resolução foi realizada após o término da administração da piridostigmina (semana 15).

Para a realização do exame ecocardiográfico os animais foram anestesiados em câmara própria através da inalação do gás isoflurano a 5% na concentração de 1ml/ml. Após indução, o plano anestésico foi mantido com respiração espontânea em máscara a 2,5% (Cristalia, São Paulo).

Foi realizada tricotomia do tórax e os animais posicionados em decúbito lateral esquerdo para aquisição das imagens através do ecocardiógrafo Vevo 2100 (FujiFilm VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Canadá) equipado com transdutor linear e multifrequencial de 13MHz.

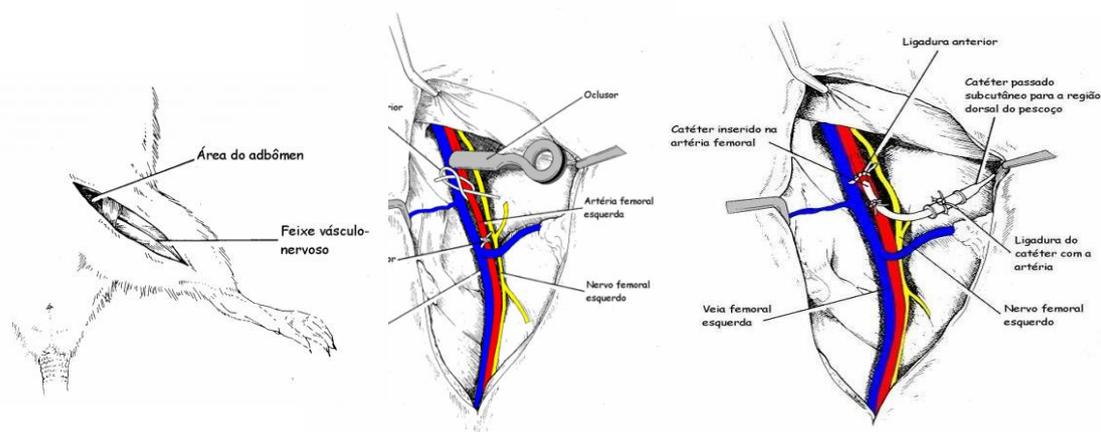
A partir do corte longitudinal da via de saída do ventrículo esquerdo foram obtidas as seguintes medidas: diâmetro da artéria aorta e do atrio esquerdo. Pelos cortes apicais 4 e 5 câmaras foram obtidos: velocidade máxima da onda E, velocidade máxima da onda A, tempo de desaceleração da onda E tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), tempo de contração isovolumétrica (TCIV), velocidade máxima da onda E', velocidade máxima da onda A' e tempo de ejeção. A partir destas variáveis obtidas foram calculados: relação E/A, relação E'/A' relação E/E', relação E/TRIV e índice de TEI.

Através do corte transverso do ventrículo esquerdo foram obtidos: espessura das paredes anterior e posterior (sistólica e diastólica), diâmetro diastólico, diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo. Foram calculados a partir destas medidas: massa do ventrículo esquerdo, fração de ejeção e fração de encurtamento (Bilate et al., 2003; Pires et al., 2003).

As mensurações ecocardiográficas seguiram as padronizações do Comitê de Padronização da Sociedade Americana de Ecocardiografia (SALEMI et al., 2005).

### 3.09 Cirurgia de canulação

Para os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com gás isoflurano a 5% (1 mL/mL), com manutenção da anestesia a 2,5% (Cristália, São Paulo). Em seguida, foram posicionados em decúbito dorsal para a realização de uma pequena incisão na região inguinal, através da qual foram implantados os cateteres. Os cateteres foram confeccionados com tubos de Micro-Renathane (MRE-025; diâmetro externo de 0,61 mm e diâmetro interno de 0,28 mm; Braintree Scientific) e Policloreto de Vinila (Abbott), equivalente ao tubo de polietileno (PE50), previamente esticados em ar quente. Estes foram preenchidos com solução de cloreto de sódio a 0,9% (NaCl) e ocluídos com pinos de aço inoxidável. Os cateteres foram então posicionados no interior da artéria e veia femorais, respectivamente, para possibilitar o registro da pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC) e a administração de fármacos. Após o implante, os cateteres foram exteriorizados na região cervical do dorso do animal e fixados à pele com fio de algodão (D'Avila et al., 1999; Flues et al., 2010; Irigoyen et al., 2005; Souza et al., 2007). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições assépticas, sob visualização de um microscópio cirúrgico (DF Vasconcelos, modelo MCM 5, São Paulo) (Figura 5).



**Figura 05.** Ilustrações do procedimento de canulação: a esquerda: posição anátomo cirúrgica; ao centro e à direita estão representadas etapas do procedimento.

O controle da dor pós-operatória foi realizado por meio da administração de cloridrato de tramadol [50 mg/mL], na dose de 30 ou 10 mg/kg, por via intraperitoneal (IP), a cada 12 horas, durante dois dias consecutivos. Além disso, todos os animais receberam uma dose única de 20 mg/kg do antibiótico cefazolina [100 mg/mL], administrada por via intramuscular (IM) imediatamente após a realização do procedimento cirúrgico.

### ***3.10 Registros da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca de Repouso***

Os registros foram realizados 24 horas após a canulação, com os animais acordados. Para as avaliações hemodinâmicas sistêmicas, a cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm (PE-50), permitindo a livre movimentação do animal dentro da caixa durante todo o período experimental. Essa extensão foi ligada a um transdutor eletromagnético (Blood Pressure XDCR; Kent Scientific, Torrington, CT, EUA), que, por sua vez, estava conectado a um pré-amplificador (Stemtech, EUA). Os sinais de pressão arterial foram registrados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (Windaq, DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA). Esse sistema permitiu a análise batimento a batimento dos pulsos de pressão, com uma frequência de amostragem de 2000 Hz por canal, possibilitando o estudo dos seguintes parâmetros: pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Os valores de frequência cardíaca foram derivados automaticamente a partir do sinal pulsátil da pressão arterial (Figura 6). Cada batimento cardíaco foi identificado utilizando um algoritmo implementado no Windaq/DATAC, que detecta automaticamente os intervalos P-P da onda sistólica e da onda do sinal de pressão arterial. Após essa detecção automática, foi realizada uma verificação visual para identificar e/ou corrigir eventuais marcações incorretas. Em seguida, foi gerada a série temporal de cada um dos sinais a serem analisados, ou seja: o intervalo de pulso cardíaco (tacograma) e a pressão arterial sistólica (sistograma). Por fim, os dados foram armazenados em arquivos para posterior análise.

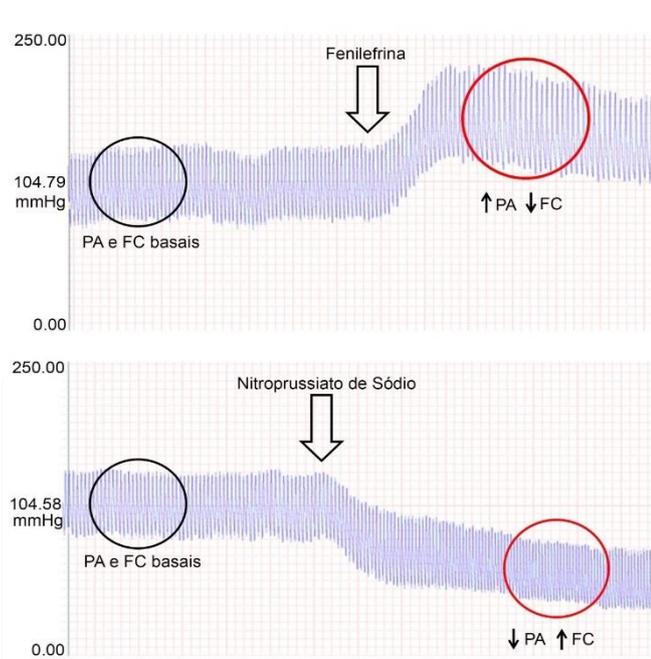


**Figura 06.** Sistema de registro de pressão arterial mostrando a cânula ligada ao transdutor eletromagnético.

### ***3.11 Sensibilidade dos Pressorreceptores***

Após a obtenção do registro basal, uma extensão de aproximadamente 20 centímetros de polietileno (PE-10) foi conectada à cânula venosa, possibilitando a injeção de drogas vasoativas. A sensibilidade dos pressorreceptores foi avaliada por meio da infusão de doses crescentes de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company). As doses administradas de fenilefrina foram: 0,25; 0,5; 1; 2; 4 e 8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Para o nitroprussiato de sódio, as doses utilizadas foram de 0,5; 1; 2; 4 e 8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Quando a pressão arterial (PA) não apresentava uma diferença de, pelo menos, 40 mmHg entre o valor de repouso e o efeito máximo da droga, foram aplicadas doses suplementares de 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para a fenilefrina e 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para o nitroprussiato de sódio. Para a avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores, o pico máximo ou mínimo da pressão arterial média (PAM) foi subtraído do valor correspondente no período controle. De forma análoga, a variação máxima da frequência cardíaca (FC) foi mensurada mediante a subtração do valor basal da FC imediatamente antes da infusão das drogas. Dessa forma, foi possível quantificar as respostas cardiovasculares. A sensibilidade barorreflexa foi expressa pelo índice obtido a partir da divisão da variação da frequência cardíaca (FC) pela variação da pressão arterial média (PAM), conforme descrito por De Angelis et al. (1997), De Angelis Lobo D'Avila et al. (1999) e Irigoyen et al. (2005). A fenilefrina, um potente agonista  $\alpha$ 1-adrenérgico, cuja ação predominante ocorre nas arteríolas periféricas, foi utilizada para induzir um aumento da pressão arterial. O referido aumento foi acompanhado por uma bradicardia reflexa, mediada pelos pressorreceptores. Em contrapartida, o nitroprussiato de sódio, um potente vasodilatador que atua tanto sobre arteríolas quanto veias, foi

empregado para provocar uma redução da pressão arterial. O mecanismo de ação do fármaco envolve a ativação da guanilato ciclase e o consequente aumento da síntese de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) na musculatura lisa vascular e em outros tecidos. A redução da pressão arterial (PA) foi seguida por uma taquicardia reflexa, também mediada pelos pressorreceptores (Figura 7).



**Figura 07.** Registro da pressão arterial e frequência cardíaca antes e após a administração de drogas vasoativas.

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

A partir dos registros basais obtidos com os animais acordados, foi possível realizar a análise tempo-frequência da variabilidade da pressão arterial sistólica (VPAS) e da variabilidade da frequência cardíaca (VFC). Para a análise no domínio do tempo, inicialmente foram calculados os valores médios da pressão arterial sistólica (PAS) e da frequência cardíaca (FC). Em seguida, a variabilidade dessas variáveis foi quantificada por meio da média dos desvios padrão. A análise no domínio da frequência foi realizada a partir da decomposição espectral do sistograma por meio da Transformada Rápida de Fourier (FFT). Após o processamento matemático, foram obtidas as potências absolutas da banda de baixa frequência (BF; 0,15–0,75 Hz), conforme descrito por Soares et al.

(2004). A variabilidade do intervalo de pulso (VIP) foi calculada a partir da análise do tacograma, gerado a partir dos registros da PAS, em que a frequência dos batimentos cardíacos foi determinada pelo intervalo entre dois picos sistólicos consecutivos.

Para a análise espectral da VIP e da VPAS, as séries temporais foram armazenadas em formato de texto e posteriormente analisadas utilizando o software Cardioseries 2.4, aplicando-se a FFT para decompor os sinais de onda em espectros de potência. Foram utilizados registros estáveis, com duração de 30 minutos e frequência de amostragem de 2000 Hz. Além do componente de baixa frequência (BF), outro parâmetro considerado foi o de alta frequência (AF; 0,75–3,0 Hz). O componente BF foi interpretado como um indicador da atividade simpática, enquanto o componente AF foi utilizado como indicador da atividade parassimpática. A relação BF/AF foi calculada para estimar o balanço simpato-vagal, conforme estabelecido por Pagani (Massimo Pagani et al., 1989; Pagani et al., 1988)

### ***3.13 Avaliação de Resistência à Insulina (ITT)***

Após 24 horas do início do procedimento, os animais foram mantidos em jejum por duas horas e, em seguida, anestesiados com tiopental sódico (10 mg/kg, via endovenosa) (Cristália, SP) para a avaliação da resistência à insulina. Foi administrada uma injeção endovenosa de insulina na dose de 0,75 U/kg, com amostras de sangue coletadas nos tempos 0, 4, 8, 12 e 16 minutos após a injeção. A glicemia plasmática foi determinada a partir de amostras obtidas pela veia caudal, utilizando um glicosímetro portátil (Accu-Chek, Roche). Os valores de glicemia obtidos entre os minutos 4 e 16 foram utilizados para o cálculo da constante de queda da glicose sanguínea (KITT), conforme metodologia descrita por Bonora et al. (1989) (BONORA et al., 1989).

### ***3.14 Eutanásia e coleta de tecidos para processamento do coração***

Ao final dos experimentos, parte dos animais de todos os grupos foram submetidos à eutanásia e os tecidos (coração, baço, pulmão, fígado, pâncreas, rins, musculo sóleo) foram imediatamente removidos e armazenados inicialmente em nitrogênio líquido para posteriores quantificações de marcadores do estresse oxidativo.

Os demais animais dos grupos foram submetidos a eutanásia por overdose de tiopental sódico [10mg/Kg] via endovenosa (Cristália, SP), após parada cardiorespiratória foi realizada a toracotomia e realizada a perfusão dos tecidos, com solução de 4% de formal tamponado para a sua conservação e posterior análise histológica.

### ***3.15 Análise histológica***

Após a eutanásia, os animais foram perfundidos com solução de formol a 4% tamponada, e os tecidos foram coletados e imediatamente fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (pH 7,0). Em seguida, os tecidos fixados foram cortados no sentido transversal dos ventrículos, alocados em cassetes histológicos, desidratados em gradiente alcoólico (de 70% a 100%), diafanizados em xilol e emblocados em parafina. Cada bloco histológico foi identificado, e a partir deles foram obtidos cortes histológicos de 5 µm de espessura, os quais foram alocados em lâminas de vidro silanizadas. Para a coloração com hematoxilina-eosina (HE), os cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em gradiente alcoólico (de 70% a 100%) e em água, sendo posteriormente corados com Hematoxilina de Harris por 2 minutos. Após essa etapa, os cortes foram lavados em água corrente e corados com eosina por 10 minutos. Em seguida, novamente lavados em água corrente, foram desidratados em gradiente alcoólico (95% e 100%), diafanizados em xilol e montados com lamínula de vidro e Entellan. Para a coloração pelo Picrosirius Red, os cortes histológicos também foram desparafinizados em xilol, hidratados em gradiente alcoólico (70% a 100%) e água, e posteriormente corados por uma hora em solução a 0,1% de Picrosirius Red, dissolvida em solução aquosa saturada de ácido pícrico. Após a coloração, os cortes foram lavados em água corrente, desidratados em gradiente alcoólico (70% a 100%), diafanizados em xilol e montados com lamínula de vidro e Entellan.

### ***3.16 Análise quantitativa das fibras colagênicas***

Os cortes histológicos, preparados e corados com Picrosirius Red, foram utilizados para a quantificação das fibras de colágeno. O corante Sirius Red é uma molécula alongada, contendo seis grupamentos sulfônicos ácidos e quatro grupamentos cromofóricos diazócicos. A interação entre os grupamentos sulfônicos e os aminoácidos

básicos presentes nas diferentes moléculas de colágeno é de elevada intensidade, resultando numa coloração vermelha pronunciada. Esta característica facilita a identificação das moléculas de colágeno em cortes histológicos.

As imagens analisadas foram obtidas por meio da digitalização das lâminas histológicas, utilizando o sistema Scanscope CS System (Aperio Technologies, Inc., CA, EUA), equipado com a objetiva Olympus UPlanSApo 20x (especificações 40x/0.75), acoplada ao scanner.

As imagens digitalizadas foram transferidas para o programa informático de análise de imagens digitais Aperio ImageScope View (Aperio Technologies, Inc., CA, EUA). A partir dessas imagens, procedeu-se à delimitação manual das áreas correspondentes aos ventrículos esquerdo e direito. A partir da delimitação estabelecida, o software quantificou automaticamente a área total de tecido de cada ventrículo, bem como a quantidade de colágeno presente nas respectivas regiões.

### ***3.17 Avaliações de Estresse oxidativo***

A preparação do tecido cardíaco foi iniciada com a pesagem do coração, logo após foi adicionado buffer fosfato buffer fosfato 30 mM com KCl 120 mM e pH 7,4 e fluoreto de fenil-metil-sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mmol/L. Em seguida, o tecido foi homogeneizado durante 30 segundos, centrifugados por 10 minutos a 3000-4000 rpm, em centrífuga refrigerada, e o sobrenadante foi estocado em freezer a -80°C. As proteínas em tecido cardíaco foram quantificadas pelo método descrito por Lowry et al. (1951), que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/mL. (O. H. Lowry et al., 1951).

O presente estudo avaliou o EO em tecido cardíaco por meio de técnicas baseadas na avaliação de produtos de oxidação de biomoléculas (lipoperoxidação (TBARS) e oxidação de proteína (carbonilas), avaliação de produtores (EROs: peróxido de hidrogênio e NADPH oxidase) e inibidores (antioxidantes enzimáticos: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e de lesão tecidual. Além disso, foi avaliada a capacidade antioxidante não enzimática (FRAP) e produção de NO por meio de nitritos.

Medida de lipoperoxidação por ácido tiobarbitúrico (TBARS) A análise de lipoperoxidação por ácido tiobarbitúrico foi iniciada pela adição de ácido tricloroacético (TCA, 20%, p/v) ao homogeneizado para precipitar proteínas em acidificar a amostra.

Essa mistura, então, foi centrifugada a 4000 rpm durante 10 minutos e adicionado ao sobrenadante o ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,67%, p/v). Na sequência, a mistura foi aquecida durante 30 minutos a 100°C e ao término foram colocadas no gelo por 1-2 minutos para parar a reação. Por fim, foi realizada a leitura em espectrofotômetro à 535 nm (Ohkawa; Ohishi; Yagi, 1979).

Dosagem de proteínas carboniladas (carbonilas): o ensaio para detecção das carbonilas é uma das técnicas utilizadas para a determinação de proteínas modificadas a partir da oxidação. A técnica se baseia na reação das proteínas oxidadas do homogeneizado cardíaco com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 10 mM) em meio ácido, seguido de sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos e incubação final com guanidina. As amostras foram incubadas com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH, 10 mM) em uma solução de HCl 2,5 M e pH de 2,5 por 1 h à temperatura ambiente no escuro, sendo agitadas em vórtex a cada 15 minutos. Subsequentemente, uma solução de ácido tricloroacético (TCA, 1ml) a 20% (p/ v) foi adicionada e a solução foi incubada em gelo por 10 minutos e centrifugada por 5 minutos a 2000 rpm em temperatura ambiente para coletar precipitados de proteína. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado TCA a 10% (1ml) (p/v). Novamente foi agitado em vortex e centrifugado por 3 minutos a 2000 rpm. Após novo descarte de sobrenadante, foi realizada lavagem com 1ml de etanol/acetato de etila (1:1), agitado em vortex e centrifugado. Esse sedimento foi lavado entre duas-três vezes com etanol/acetato de etila (1:1) (v/v). Os precipitados finais foram dissolvidos em solução de cloridrato de guanidina 6 M (500µL), agitados em vortex e incubados por 15 minutos a 37°C em banho-maria. Por fim, foram centrifugados por 5 minutos a 7000rpm e a absorbância das carbonilas foi medida em espectrofotômetro a 360nm (Reznick; Packer, 1994).

NADPH oxidase: a atividade da NADPH oxidase foi avaliada pela produção de superóxido determinado por meio de leitura de placa. Foi utilizado buffer fosfato 50mM pH 7,4 com EDTA 2mM e sucrose 150mM, NADPH 1,3 mM e 10µL de (Wei et al., 2006). A produção de superóxido foi expressa em µmoles/mg de proteína. A leitura foi realizada a 340nm.

Peróxido de hidrogênio: a mensuração do peróxido de hidrogênio foi realizada por meio da oxidação de vermelho de fenol mediada pela peroxidase rabanete (HRP), levando a formação de um composto mensurável. Foi realizado uma curva com H<sub>2</sub>O destilada, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 250 µM, solução de peroxidase de rabanete (PRS) composto de buffer dextrose, vermelho de fenol (Sigma-Aldrich), peroxidase de rabanete

tipo II (Sigma-Aldrich) e hidróxido de sódio (NaOH, 0,5N) (FMaia Gold). Alíquotas de 70 µl de homogeneizado de coração foram incubadas em placa de Elisa juntamente com 180 µl de PRS por 25 minutos em temperatura ambiente. Após este período de incubação, foi adicionado 5 µl de NaOH e os valores de absorbância da solução medidos em equipamento leitor de placa de Elisa a 630 nm (Pick; Keisari, 1980).

Superóxido dismutase (SOD): a técnica dessa análise foi baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. Considerando a impossibilidade de determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, se utiliza a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector. A oxidação do pirogalol leva a formação de um produto colorido, detectado por espectrofotômetro a 420 nm durante 2 minutos (Marklund et al., 1983). A atividade da SOD foi determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. Foram utilizados 973 µL de tampão Tris-Fosfato a 50 mmol/L (pH 8,2), 5 µL de catalase a 30 mM, 5 µL de homogeneizado no meio da reação e 10 µL de pirogalol a 24 mmol/L. Esta curva obtida foi utilizada como branco. Também foi realizada uma curva padrão utilizando três concentrações distintas de SOD (0,72U e 0,144U), através da qual foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos.

Catalase: para a realização das medidas foi usada uma solução tampão constituída de fosfatos a 50 mmol/L em pH de 7,0. Foram adicionados 980µL deste tampão e 10µL de amostra de tecido na cubeta do espectrofotômetro, sendo esta mistura descontada contra um branco de tampão fosfato. Na sequência foram adicionados 10µL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e então foi monitorada a diminuição da absorbância no espectrofotômetro. A leitura foi realiza em um comprimento de onda de 240nm. A taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade da catalase. Desta forma, o consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser utilizado como uma medida da atividade desta enzima (Boveris; Chance, 1973).

Atividade antioxidante não enzimática (FRAP): a determinação da atividade antioxidante não enzimática medida pelo método de redução do íno ferro (FRAP) é baseada na produção de íon Fe<sup>2+</sup> (forma ferrosa) a partir da redução do íon Fe<sup>3+</sup> (forma férrica) presente no complexo 2,4,6- tripiridils-triazina (TPTZ). Assim, a mudança na absorbância, é diretamente relacionada ao 39 poder da redução total de doação de elétrons antioxidantes presentes na reação. Quando a redução ocorre, há uma alteração na

tonalidade da mistura de reação, passando de roxo claro a um roxo intenso. Quanto maior a absorbância ou intensidade da coloração, maior será o potencial antioxidante total da amostra. A técnica foi realizada em microplaca, na qual adicionou-se 290µL de reativo de FRAP (buffer acetato de sódio e ácido acético, pH de 3,6; TPTZ 10mM; cloreto férrico hexahidratado, 20mM), 10 µL de uma solução-padrão de sulfato ferroso heptahidratado e 10 µL de amostra. A microplaca foi incubada durante 5 minutos com agitação à 37°C. A leitura foi realizada a 593 nm (Benzie; Strain, 1999).

Nitritos: os níveis de nitritos foram medidos pela reação das amostras com o reagente de Griess em microplacas (96 poços) em aparelho leitor de ELISA. Na placa, 50 µl de reagente de Griess foram adicionados em alíquotas de 50 µl de amostra em temperatura ambiente. O total de nitrito tecidual foi estimado a partir de uma curva padrão de absorbância em 545 nm (Granger et al., 1999).

### ***3.18 Análise Estatística***

Utilizou-se o GraphPad Prism versão 8.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) para a análise dos dados. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados.

Os resultados descritos a seguir encontram-se divididos em duas sessões. Para fins de validação do modelo de indução do DM, foram comparados os grupos C, CF, D e DF. A comparação entre os grupos foi realizada através de ANOVA de uma via com post-hoc de Tukey quando as variáveis foram paramétricas. Nas variáveis não paramétricas realizou-se Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn's. Foram considerados estatisticamente significativos os testes com  $p < 0,05$ .

Em seguida para demonstrar os efeitos do tratamento com a piridostigmina foram comparados os grupos: CF, CFP, DF e DFP. A comparação entre os grupos foi realizada através de ANOVA de duas vias com post-hoc de Tukey. A associação entre variáveis foi analisada por meio da correlação de Person. Foram considerados estatisticamente significativos os testes com  $p < 0,05$ .

## ***RESULTADOS***

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Validação do modelo de DM2 com Frutose+ STZ

#### 4.1.1 Avaliações Metabólicas

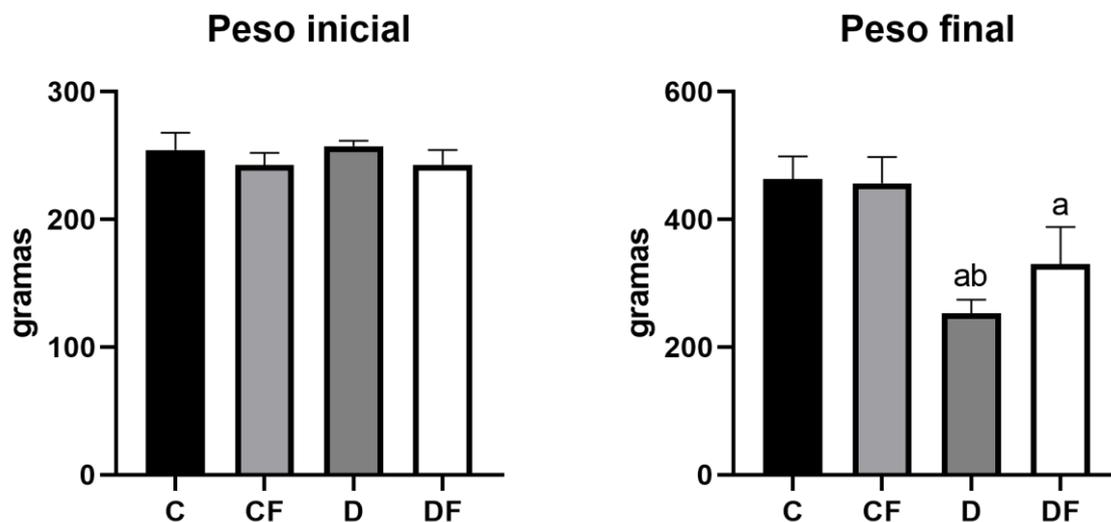
##### 4.1.1.1 Peso corporal

A Tabela 1 apresenta os dados de peso corporal de todos os grupos nos momentos inicial e final do protocolo experimental. No início do estudo, os pesos corporais eram semelhantes. Ao final do protocolo, observou-se aumento do peso corporal nos grupos controle, sem efeito adicional associado ao consumo de frutose. Por outro lado, os animais de ambos os grupos diabéticos exibiram peso corporal significativamente menor em comparação com o grupo C, com redução adicional do grupo D em relação ao CF (Figura 08)

**Tabela 01** – Peso corporal dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) no início e no final do protocolo.

<b>Peso (g)</b>	<b>Inicial</b>	<b>Final</b>
<b>C</b>	254,4 ± 13,37	463,4 ± 35,2
<b>CF</b>	242,5 ± 9,5	456,9 ± 40,6
<b>D</b>	257,3 ± 4,4	253,0 ± 21,1 <sup>ab</sup>
<b>DF</b>	242,8 ± 11,5	330,2 ± 57,8 <sup>a</sup>

Dados representam média ± DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo C no mesmo momento; <sup>b</sup> p<0,05 em relação ao grupo CF no mesmo momento



**Figura 08.** Peso corporal dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10). Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. C, <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CF, no início e final do protocolo.

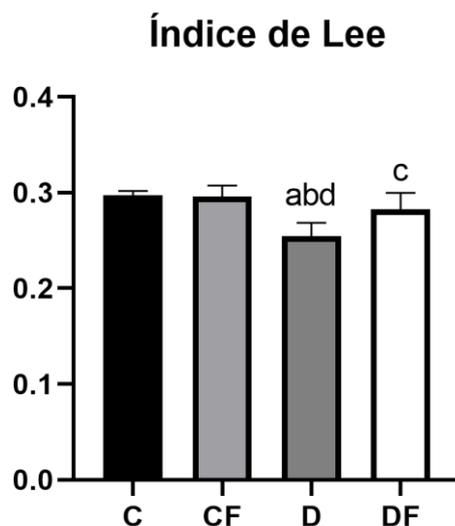
#### 4.1.1.2 Índice de massa corpórea (Índice de Lee)

Observou-se uma redução no índice de massa corpórea (Índice de Lee) no grupo D em relação aos demais grupos. (Tabela 02 e Figura 09).

**Tabela 02** – Índice de Lee dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10).

	C	CF	D	DF
Lee	0,297 $\pm$ 0,004	0,296 $\pm$ 0,011	0,254 $\pm$ 0,013 <sup>ab</sup>	0,282 $\pm$ 0,017 <sup>c</sup>

Dados representam média  $\pm$  DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo C; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo CF; <sup>c</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo D.



**Figura 09.** Índice de Lee dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10). Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. C, <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CF e <sup>c</sup>  $p < 0,05$  vs. D.

#### 4.1.1.3 Glicemia e Triglicerídeos

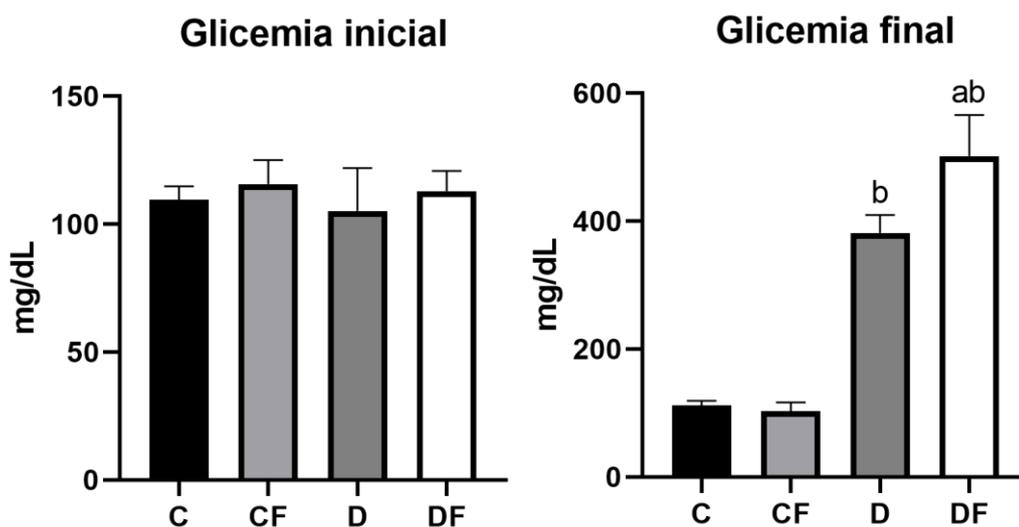
Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de glicemia entre os grupos no início do protocolo. Porém, ao final do experimento, os grupos D e DF tiveram aumento significativo da glicemia em relação aos valores basais, e aos grupos C e CF, com níveis superiores a 200 mg/dL, confirmando a efetividade da indução do DM através da administração de STZ (Tabela 03 e Figura 10).

Os níveis iniciais de triglicerídeos não apresentaram diferença entre os grupos. No entanto, ao final do protocolo, foi possível observar elevação significativa nos grupos que receberam frutose (CF e DF). O grupo D também apresentou aumento dos níveis de triglicerídeos comparado ao grupo C (Tabela 04 e Figura 11).

**Tabela 03** –Glicemia dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) no início e final do protocolo.

		Inicial	Final
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	<b>C</b>	109,6 ± 5,2	111,5 ± 7,6
	<b>CF</b>	115,7 ± 9,3	102,8 ± 13,7
	<b>D</b>	105,1 ± 16,8	381,9 ± 28,0 <sup>ab</sup>
	<b>DF</b>	112,9 ± 7,9	508,8 ± 41,4 <sup>ab</sup>

Dados representam média ± DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo C no mesmo momento; <sup>b</sup> p<0,05 em relação ao grupo CF no mesmo momento.

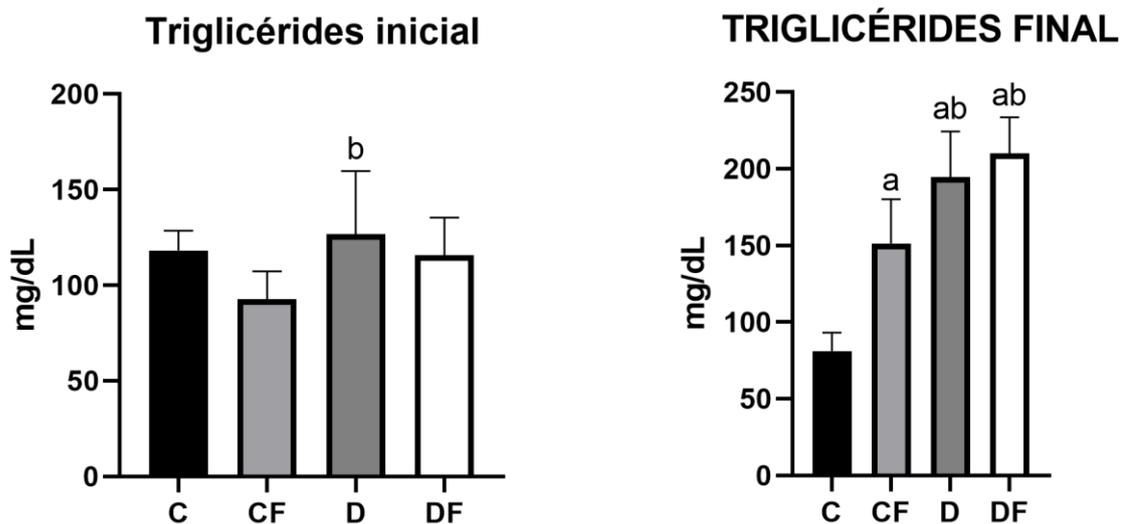


**Figura 10.** Glicemia dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10). Dados representam médias ± DPM. <sup>a</sup> p<0,05 vs. C, <sup>b</sup> p<0,05 vs. CF no mesmo momento.

**Tabela 04** –Triglicerídeos sanguíneos dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) no final do protocolo.

		Inicial	Final
<b>Triglicerídeos</b> (mg/dL)	<b>C</b>	118,3 ± 10,3	81,1 ± 12,1
	<b>CF</b>	92,5 ± 14,8	151,4 ± 28,6 <sup>a</sup>
	<b>D</b>	126,8 ± 33,0	194,6 ± 29,7 <sup>ab</sup>
	<b>DF</b>	115,8 ± 19,5	209,8 ± 23,9 <sup>ab</sup>

Dados representam média ± DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo C no mesmo momento; <sup>b</sup> p<0,05 em relação ao grupo CF no mesmo momento.



**Figura 11.** Triglicerídeos sanguíneos dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10). Dados representam médias ± DPM. <sup>a</sup> p<0,05 vs. C, <sup>b</sup> p<0,05 vs. CF no mesmo momento.

#### 4.1.1.4 Teste de tolerância à insulina (ITT)

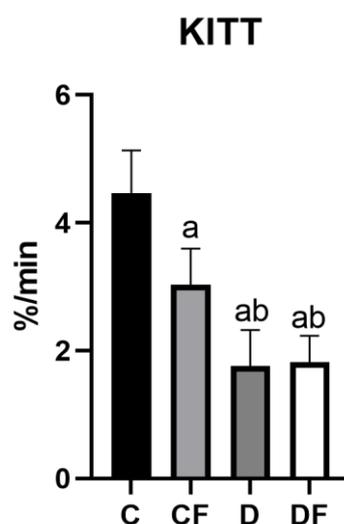
Os resultados observados no teste de tolerância à insulina realizados ao final do protocolo estão mostrados na Tabela 05 (Figura 12).

**Tabela 05** – Constante de decaimento da glicose (KITT) nos animais dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10), no final do protocolo.

	C	CF	D	DF
<b>KITT</b> <b>(%/min)</b>	4,46 ± 0,67	3,03 ± 0,57 <sup>a</sup>	1,76 ± 0,56 <sup>ab</sup>	1,82 ± 0,41 <sup>ab</sup>

Dados representam média ± DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo C; <sup>b</sup> p<0,05 em relação ao grupo CF.

O grupo CF apresentou redução do KITT em relação ao grupo C. Os animais dos grupos D e DF apresentaram redução significativa no KITT (constante de decaimento da glicose) durante o teste de tolerância à insulina em comparação ao grupo C e CF, indicando resistência à ação da insulina nos grupos diabéticos.



**Figura 12.** Constante de decaimento da glicose (KITT) no teste de tolerância à insulina (ITT) dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10). Dados representam médias ± DPM. <sup>a</sup> p<0,05 vs. C e <sup>b</sup> p<0,05 vs. CF.

## 4.2 Avaliações Ecocardiográficas

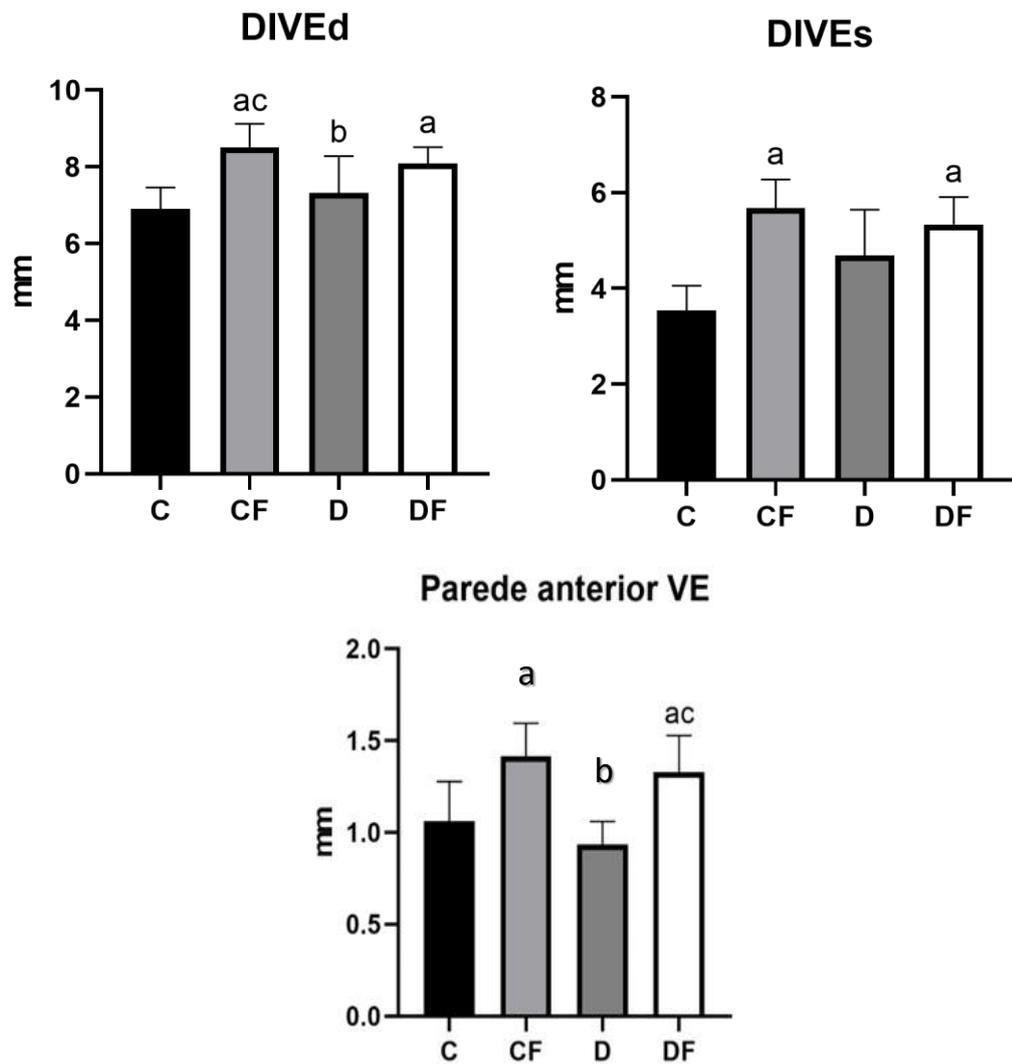
### 4.2.1 Morfometria cardíaca

Os animais que consumiram frutose (CF e DF) tiveram maior diâmetro diastólico e sistólico em comparação ao C, sugerindo presença de remodelamento ventricular do tipo excêntrico. O diâmetro diastólico e a espessura da parede anterior na diástole estava aumentada no grupo CF em relação ao grupo D. A espessura da parede anterior na diástole estava aumentada no grupo DF em relação ao grupo D. Ainda estes animais apresentaram maior espessura diastólica da parede anterior do VE sugerindo a existência de hipertrofia ventricular (Tabela 06 e Figura 13).

**Tabela 06** – Parâmetros morfométricos do ventrículo esquerdo dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo. VE = Ventrículo Esquerdo.

Avaliações	C	CF	D	DF
<b>Ecocardiográficas</b>				
<b>Diâmetro diastólico (mm)</b>	6,90 ± 0,55	8,51 ± 0,60 <sup>a</sup>	7,32 ± 0,95 <sup>b</sup>	8,09 ± 0,42 <sup>a</sup>
<b>Diâmetro sistólico (mm)</b>	3,54 ± 0,51	5,67 ± 0,59 <sup>a</sup>	4,69 ± 0,95	5,33 ± 0,57 <sup>a</sup>
<b>Espessura da parede anterior – diástole (mm)</b>	1,06 ± 0,21	1,41 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,33 ± 0,19 <sup>ac</sup>
<b>Espessura da parede posterior – diástole (mm)</b>	1,28 ± 0,29	1,41 ± 0,15	1,17 ± 0,20	1,24 ± 0,12

Dados representam média ± DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo C; <sup>b</sup> p<0,05 em relação ao grupo CF; <sup>c</sup> p<0,05 em relação ao grupo D.



**Figura 13.** Parâmetros morfométricos do ventrículo esquerdo dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup> p<0,05 vs. C, <sup>b</sup> p<0,05 vs. CF, <sup>c</sup> p<0,05 vs. D e <sup>d</sup> p<0,05 vs. DF.

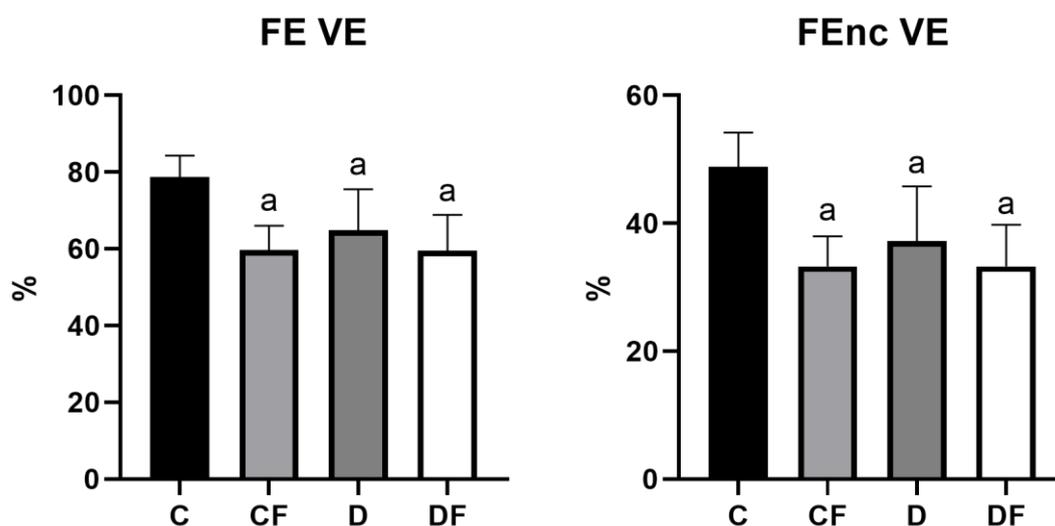
### 4.2.2 Função cardíaca

Ao avaliar a função sistólica pelo ecocardiograma notou-se que todos os grupos (CF, D e DF) apresentaram um decréscimo na função sistólica em relação ao grupo C, observada nos parâmetros de fração de ejeção e fração de encurtamento (Tabela 07 e Figura 14).

**Tabela 07**– Função sistólica do ventrículo esquerdo dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo.

Avaliações	C	CF	D	DF
<b>Ecocardiográficas</b>				
<b>Fração de Ejeção (%)</b>	78,72 ± 5,5	59,67 ± 6,30 <sup>a</sup>	64,84 ± 10,7 <sup>a</sup>	59,54 ± 9,3 <sup>a</sup>
<b>Fração de Encurtamento (%)</b>	48,83 ± 5,3	33,30 ± 4,6 <sup>a</sup>	37,22 ± 8,5 <sup>a</sup>	33,29 ± 6,4 <sup>a</sup>
<b>Onda S'</b>	47,79 ± 5,9	44,73 ± 4,5	43,42 ± 3,7	44,63 ± 4,8

Dados representam média ± DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo C.



**Figura 14.** Função sistólica do ventrículo esquerdo dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias ± DPM. <sup>a</sup> p<0,05 vs. C.

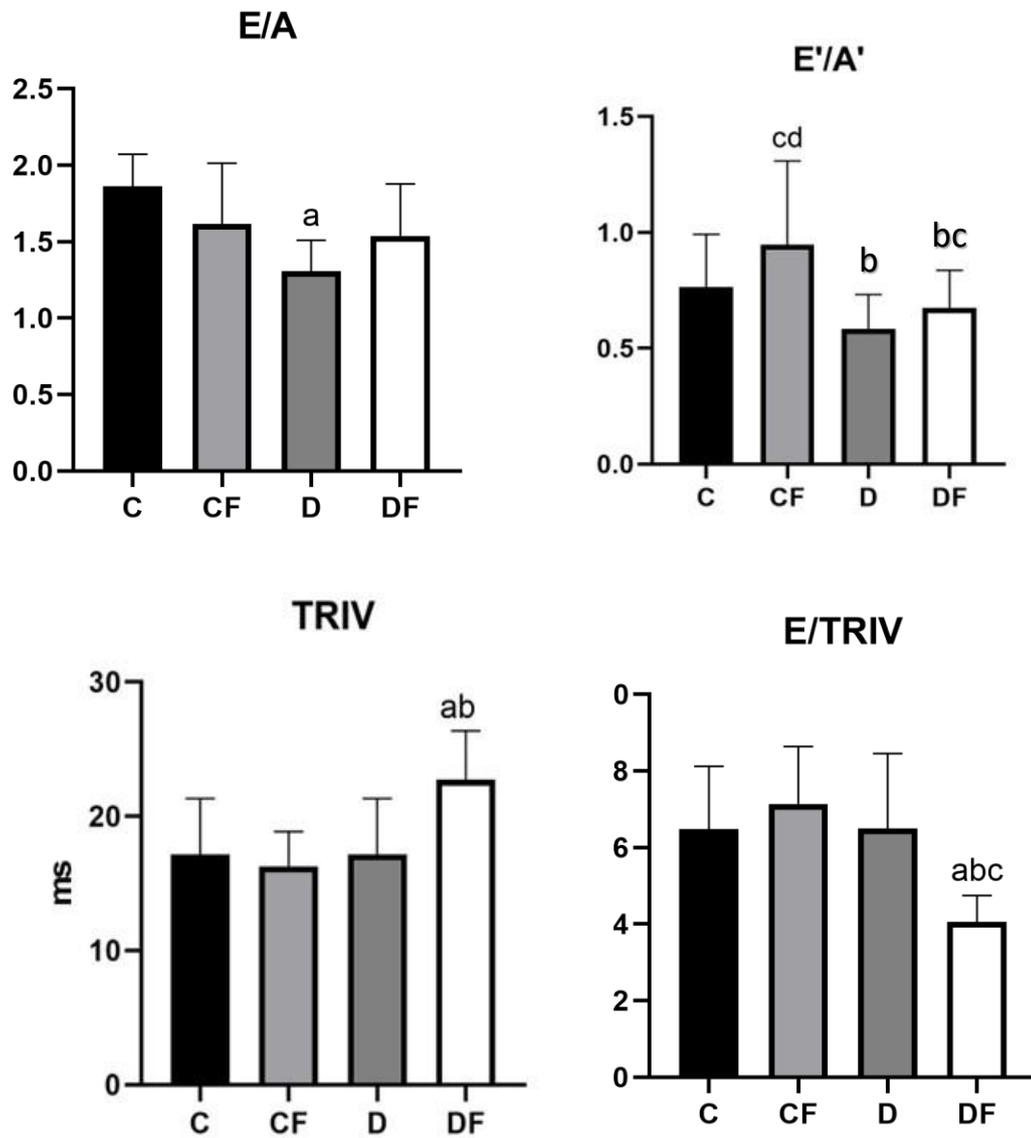
É possível notar uma disfunção diastólica, devido ao fato de encontramos um decréscimo na relação E'/A' e uma redução na desaceleração da onda E nos grupos com administração de frutose em comparação com C. Além disso, observa-se no TRIV que o D e DP foram aumentados em relação ao C, CF e CP. Nesta mesma variável notou-se que os grupos sem diabetes e que receberam frutose apresentaram uma redução em relação ao grupo C (Tabela 8 e Figura 15).

Os dados sugerem a presença de disfunção diastólica nos grupos que receberam frutose, evidenciada pela redução na razão E'/A' e pela diminuição no tempo de desaceleração da onda E, em comparação ao grupo C. Além disso, os valores de TRIV estavam aumentados nos grupos D e DF em relação aos grupos C, CF e Notou-se que entre os grupos não diabéticos, aqueles que receberam frutose apresentaram valores de TRIV reduzidos em comparação ao grupo C (Tabela 8 e Figura 15).

**Tabela 08** – Função diastólica do ventrículo esquerdo dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo.

<b>Avaliações</b>	<b>C</b>	<b>CF</b>	<b>D</b>	<b>DF</b>
<b>Ecocardiográficas</b>				
<b>Relação E/A</b>	1,86 ± 0,21	1,61 ± 0,39	1,30 ± 0,20 <sup>a</sup>	1,53 ± 0,34
<b>Relação E'/A'</b>	0,76 ± 0,22	0,94 ± 0,36	0,58 ± 0,14 <sup>b</sup>	0,67 ± 0,16 <sup>bc</sup>
<b>TRIV (ms)</b>	17,17 ± 4,14	16,26 ± 2,59	19,70 ± 4,69	22,73 ± 3,63 <sup>ab</sup>
<b>E/TRIV</b>	6,48 ± 1,63	7,14 ± 1,50	6,49 ± 1,96	4,06 ± 0,68 <sup>abc</sup>

Dados representam média ± DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo C; <sup>b</sup> p<0,05 em relação ao grupo CF; <sup>c</sup> p<0,05 em relação ao grupo D.



**Figura 15.** Função diastólica do ventrículo esquerdo dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. C, <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CF e <sup>c</sup>  $p < 0,05$  vs. D.

### 4.3 Pressão Arterial e Frequência cardíaca

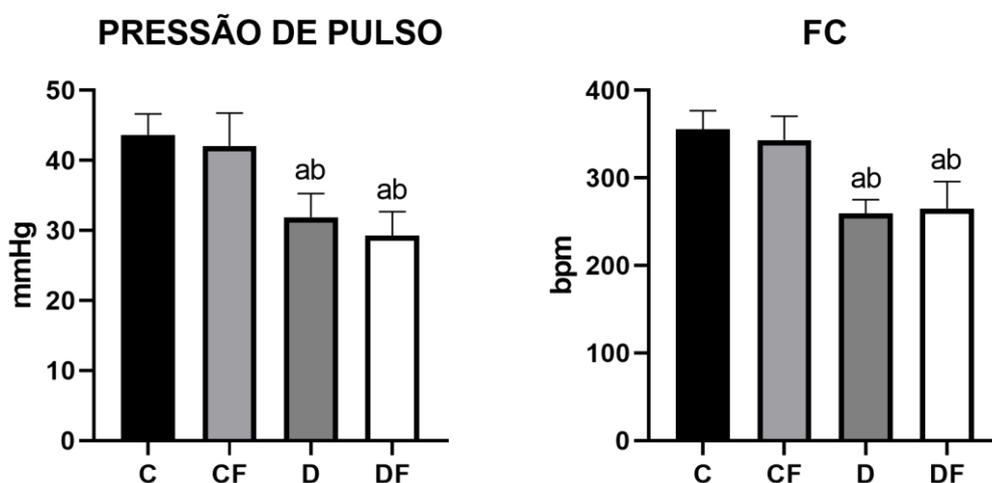
Os dados obtidos durante o Registro da Pressão Arterial direta e frequência cardíaca estão mostrados na Tabela 09.

**Tabela 09** – Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo.

	C	CF	D	DF
<b>PAS (mmHg)</b>	140,8 ± 3,4	136,5±9,2	114,3 ± 7,7 <sup>ab</sup>	111,3 ± 5,4 <sup>ab</sup>
<b>PAD (mmHg)</b>	95,90 ± 5,4	94,39 ± 5,4	82,36 ± 6,0 <sup>ab</sup>	82,08 ± 5,6 <sup>ab</sup>
<b>PAM (mmHg)</b>	115,2 ±5,3	112,9 ± 6,9	97,77 ± 6,7 <sup>ab</sup>	96,09 ± 5,5 <sup>ab</sup>
<b>PP (mmHg)</b>	43,6 ± 2,9	42,06 ± 4,6	31,91 ± 3,3 <sup>ab</sup>	29,27 ± 3,3 <sup>ab</sup>
<b>FC (bpm)</b>	355,40 ± 21,4	343,1 ± 27,4	259,4 ± 15,6 <sup>ab</sup>	265,3± 30,4 <sup>ab</sup>

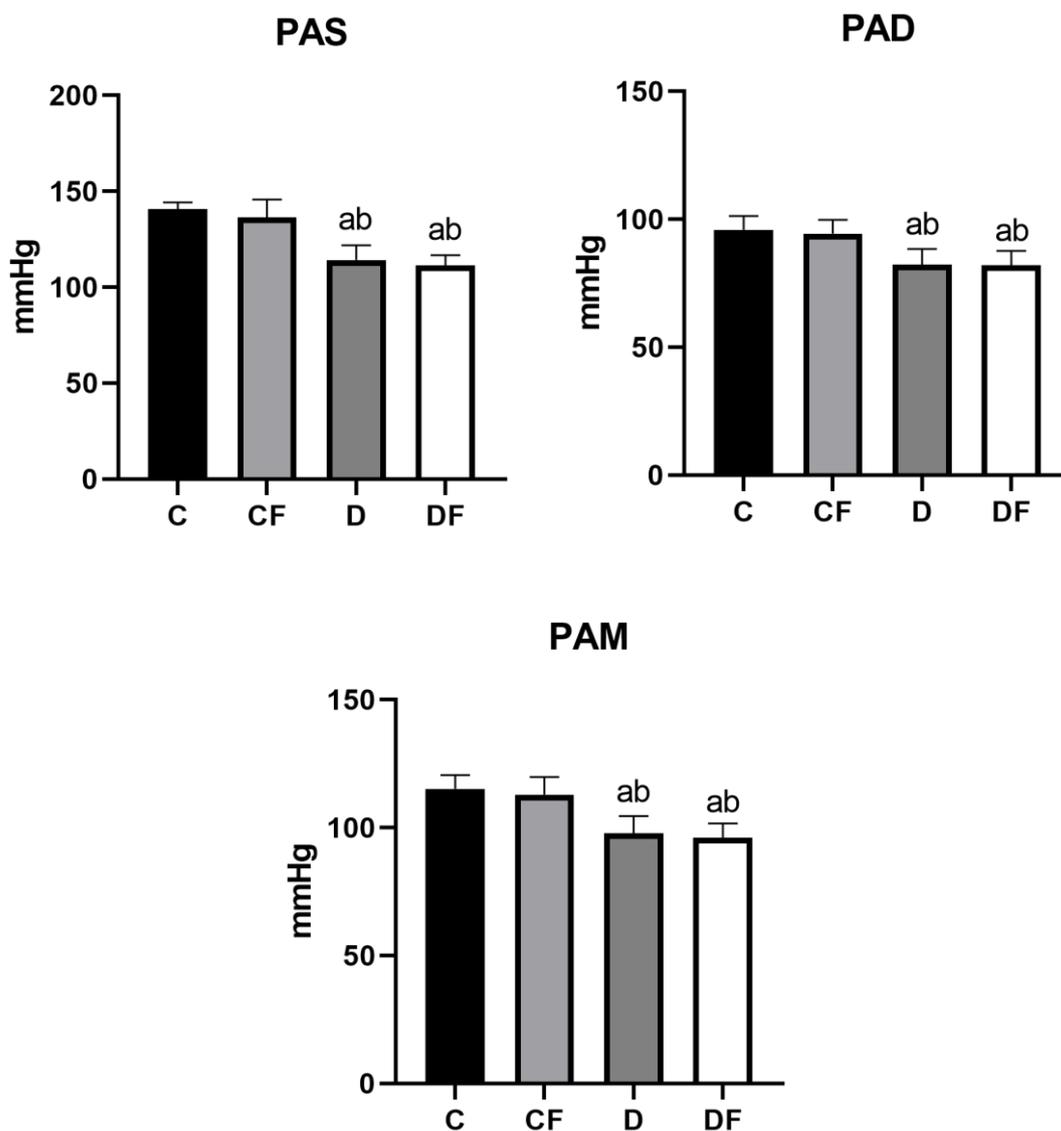
Dados representam média ± DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo C; <sup>b</sup> p<0,05 em relação ao grupo CF.

A FC apresentou-se diminuída nos grupos diabéticos (D e DF) (Tabela 09 e Figura 16).



**Figura 16.** Pressão de pulso (PP) e Frequência cardíaca (FC) dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias ± DPM. <sup>a</sup> p<0,05 vs. C e <sup>b</sup> p<0,05 vs. CF.

É possível observar que a PAS, PAD, PP e a PAM estavam reduzida nos grupos com indução de diabetes (D e DF) quando se compara com o grupo C (Tabela 09 e Figura 17).



**Figura 17.** Pressão arterial sistólica (PAS), Pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM) dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. C e <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CF.

#### 4.4 Sensibilidade barorreflexa

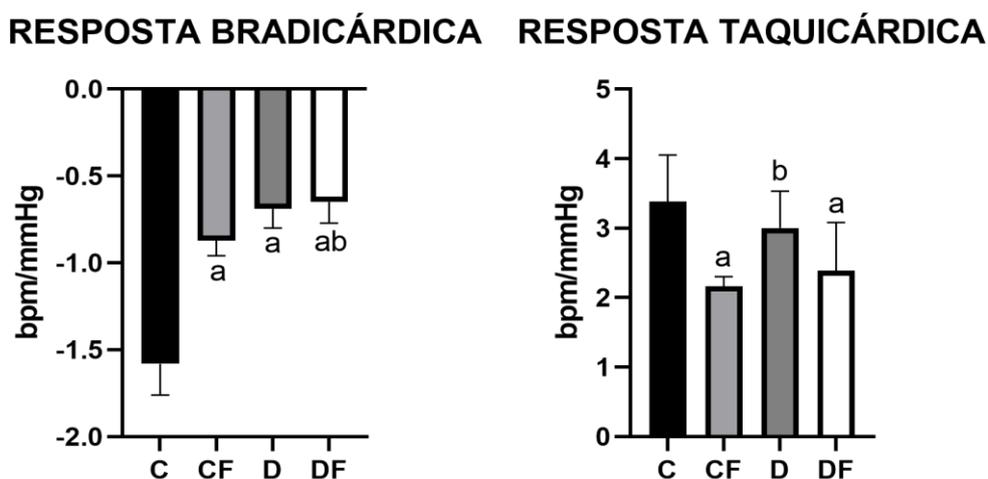
Os dados de sensibilidade dos barorreceptores estão descritos na Tabela 10.

**Tabela 10** – Sensibilidade dos Pressorreceptores dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo.

	C	CF	D	DF
<b>Resposta Bradicárdica</b> (bpm/mmHg)	-1,58 ± 0,18	-0,87 ± 0,09 <sup>a</sup>	-0,69 ± 0,11 <sup>a</sup>	-0,65 ± 0,12 <sup>ab</sup>
<b>Resposta Taquicárdica</b> (bpm/mmHg)	3,38 ± 0,67	2,16 ± 0,14 <sup>a</sup>	3,00 ± 0,53 <sup>b</sup>	2,39 ± 0,69 <sup>a</sup>

Dados representam média ± DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo C e <sup>b</sup> p<0,05 em relação ao grupo CF.

Os grupos CF, D e DF apresentaram uma diminuição na resposta bradicárdica, indicando prejuízo do componente parassimpático induzida por aumento da PA quando comparado ao grupo C. Houve redução adicional da resposta bradicárdica no grupo DF em relação ao grupo CF. Na resposta taquicárdica da sensibilidade barorreflexa, induzida por queda da PA, observou-se redução nos grupos CF e DF em relação ao grupo C. O grupo CF apresentou valores menores em relação ao grupo D (Tabela 10 e Figura 18).



**Figura 18.** Sensibilidade Barorreflexa dos grupos: dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias ± DPM. <sup>a</sup> p<0,05 vs. C e <sup>b</sup> p<0,05 vs. CF.

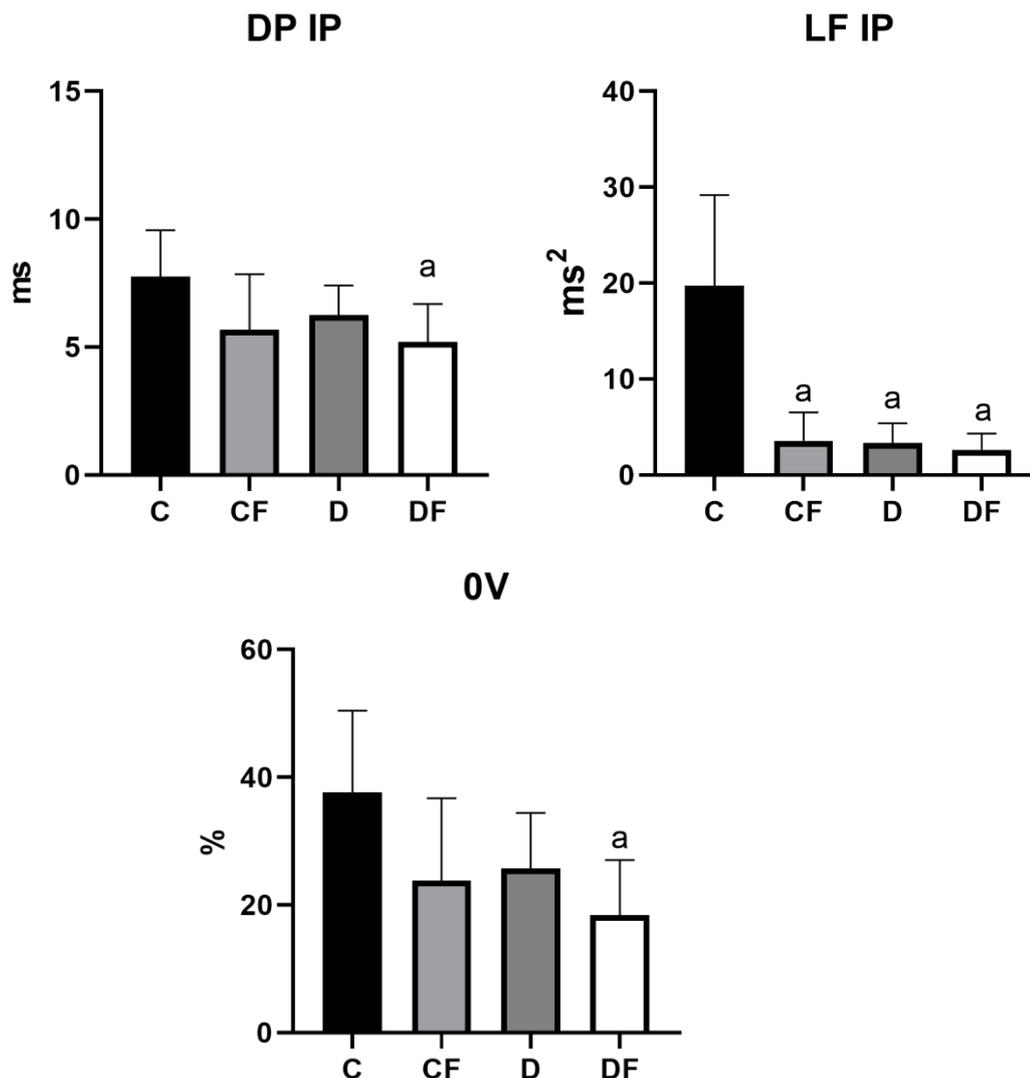
#### 4.5 Análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC)

Em relação aos índices utilizados na avaliação da variabilidade da frequência cardíaca observou-se importante redução nos valores de desvio padrão (DP IP) no grupo DF quando comparado ao grupo C, na modulação simpática do intervalo de pulso (LF IP) também houve redução nos grupos CF, D e DF, quando comparados ao grupo C. Além disso, o grupo DF apresentou redução no 0V em relação ao grupo C, conforme demonstrado na Tabela 11 (Figura 19).

**Tabela 11:** Índices de variabilidade da frequência cardíaca dos animais dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10).

	<b>C</b>	<b>CF</b>	<b>D</b>	<b>DF</b>
<b>DP IP (ms)</b>	7,75 ± 1,81	5,66 ± 2,17	6,24 ± 1,16	5,20 ± 1,47 <sup>a</sup>
<b>Var IP (ms<sup>2</sup>)</b>	62,99 ± 27,48	45,94 ± 19,53	40,17 ± 14,47	40,34 ± 20,89
<b>RMSSD (ms)</b>	6,21 ± 2,37	5,66 ± 1,97	6,82 ± 1,89	6,63 ± 1,67
<b>LF IP (ms<sup>2</sup>)</b>	19,70 ± 9,47	3,56 ± 2,94 <sup>a</sup>	3,30 ± 2,06 <sup>a</sup>	2,60 ± 1,70 <sup>a</sup>
<b>HF IP (ms<sup>2</sup>)</b>	12,85 ± 9,47	7,63 ± 4,04	11,40 ± 5,89	10,01 ± 4,21
<b>LF (nu)</b>	29,00 ± 10	26,56 ± 10,75	24,91 ± 11,87	15,22 ± 5,80
<b>HF (nu)</b>	71 ± 10	73,44 ± 10,75	75,09 ± 11,87	84,78 ± 5,80
<b>LF/HF</b>	0,47 ± 0,24	0,43 ± 0,26	0,36 ± 0,23	0,19 ± 0,08
<b>0V (%)</b>	37,61 ± 12,80	23,77 ± 12,96	25,68 ± 8,74	18,40 ± 8,62 <sup>a</sup>
<b>1V (%)</b>	36,35 ± 6,21	39,88 ± 2,94	37,49 ± 2,47	38,66 ± 7,08
<b>2V (%)</b>	26,03 ± 8,85	31,51 ± 9,69	36,85 ± 8,95	39,03 ± 12,20

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros de variabilidade da Frequência Cardíaca. DP IP (ms): Desvio Padrão do Intervalo de pulso; Var IP (ms<sup>2</sup>): Variância do Intervalo de Pulso; RMSSD (ms): Raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças dos intervalos de pulso consecutivos; LF IP: Modulação de baixa frequência absoluto (ms<sup>2</sup>) e normalizado (un); HF IP: Modulação de alta frequência absoluto (ms<sup>2</sup>) e normalizado (un); Power total: potência total do sinal; LF/HF IP: Balanço simpato-vagal; 0V (%): zero variação; 1V (%): uma variação; 2V: duas variações. <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo C.



**Figura 19.** Desvio Padrão do Intervalo de pulso (DP IP), Modulação de baixa frequência absoluto (ms<sup>2</sup>) (LF IP) e Zero variação (%) (0V) dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup> p<0,05 vs. C.

#### 4.6 Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica

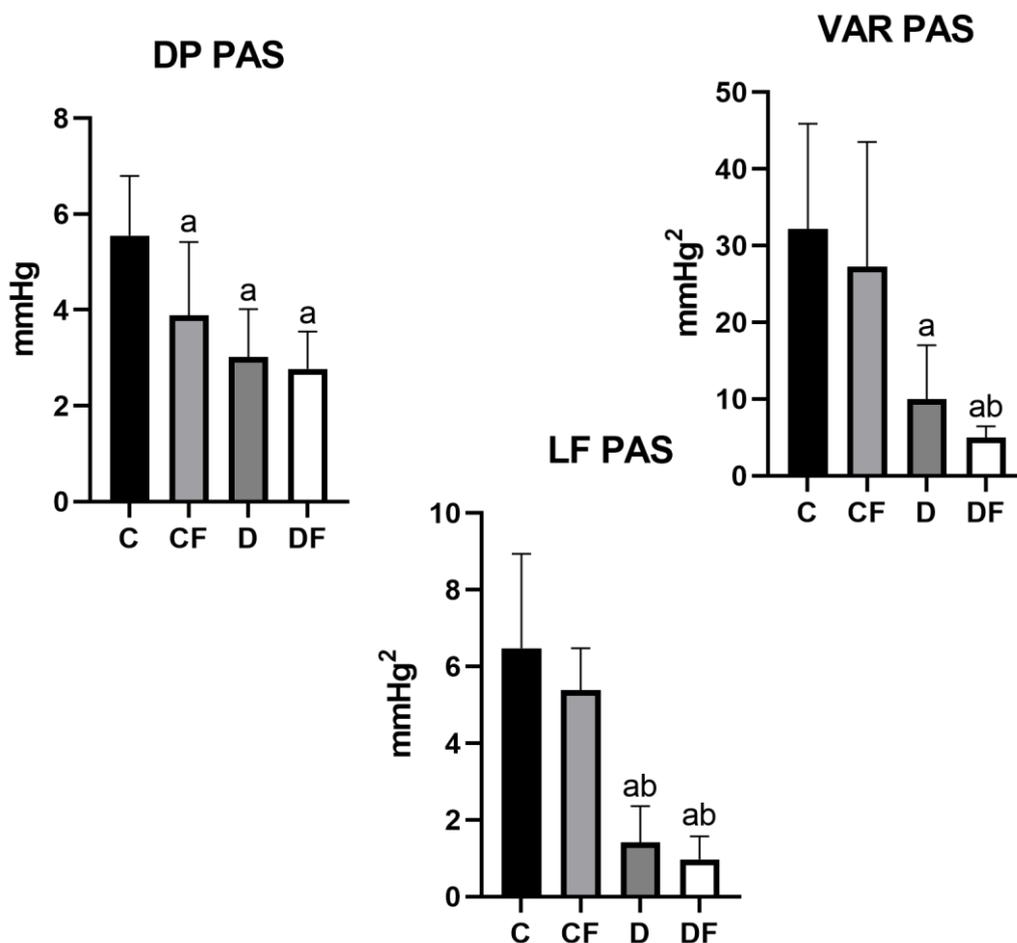
Em relação a análise da variabilidade da pressão arterial sistólica, entre os parâmetros analisados e apresentados na Tabela 12, houve diferença significativa no desvio padrão da PAS (DP PAS) dos grupos CF, D e DF em relação ao grupo C.

Nos grupos D e DF notou-se redução da variância e da modulação de baixa frequência da PAS em relação ao grupo C. Ainda, no grupo DF notou-se uma redução destes parâmetros (Var PAS e LF PAS) em relação ao grupo CF (Figura 20).

**Tabela 12:** Índices de variabilidade da pressão arterial sistólica dos animais dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10).

	C	CF	D	DF
<b>DP PAS (mmHg)</b>	5,55 ± 1,25	3,89 ± 1,53 <sup>a</sup>	3,02 ± 1,00 <sup>a</sup>	2,77 ± 0,78 <sup>a</sup>
<b>Var PAS (mmHg<sup>2</sup>)</b>	32,19 ± 13,71	27,29 ± 16,21	9,98 ± 7,04 <sup>a</sup>	4,98 ± 1,47 <sup>ab</sup>
<b>LF PAS (mmHg<sup>2</sup>)</b>	6,48 ± 2,46	5,39 ± 1,09	1,41 ± 0,95 <sup>ab</sup>	0,97 ± 0,60 <sup>ab</sup>

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros de variabilidade da Pressão arterial sistólica. DP PAS (mmHg): Desvio Padrão da pressão arterial sistólica; Var PAS (mmHg<sup>2</sup>): Variância da pressão arterial sistólica; LF PAS: Modulação de baixa frequência da pressão arterial sistólica (mmHg<sup>2</sup>). <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo C e <sup>b</sup> p<0,05 em relação ao grupo CF.



**Figura 20.** Variabilidade da Pressão arterial sistólica. DP PAS (mmHg): Desvio Padrão da pressão arterial sistólica; Var PAS (mmHg<sup>2</sup>): Variância da pressão arterial sistólica; LF PAS: Modulação de baixa frequência da pressão arterial sistólica (mmHg<sup>2</sup>), dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias ± DPM. <sup>a</sup> p<0,05 vs. C e <sup>b</sup> p<0,05 em relação ao grupo CF.

#### 4.7 Quantificação do colágeno em tecido cardíaco

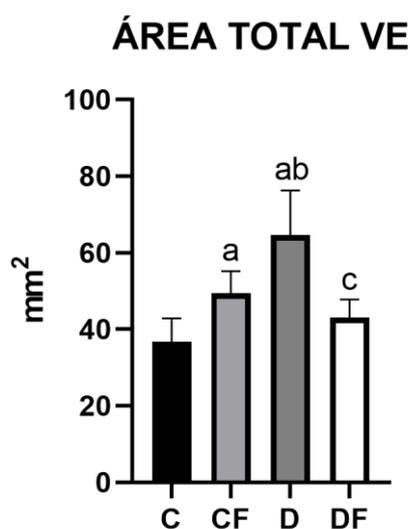
Podemos observar o aumento da área total do VE nos grupos CF e D, em relação ao grupo C. Contudo, não se observa mudanças na área total do VD entre os grupos.

Em relação ao colágeno (% total de colágeno no VE, % de colágeno/mm<sup>2</sup> no VE e % total de colágeno no VD), nota-se expressivo aumento de sua deposição nos grupos que ingeriram frutose (CF e DF) em relação ao grupo C (Tabela 13 e Figuras 21, 22 e 23).

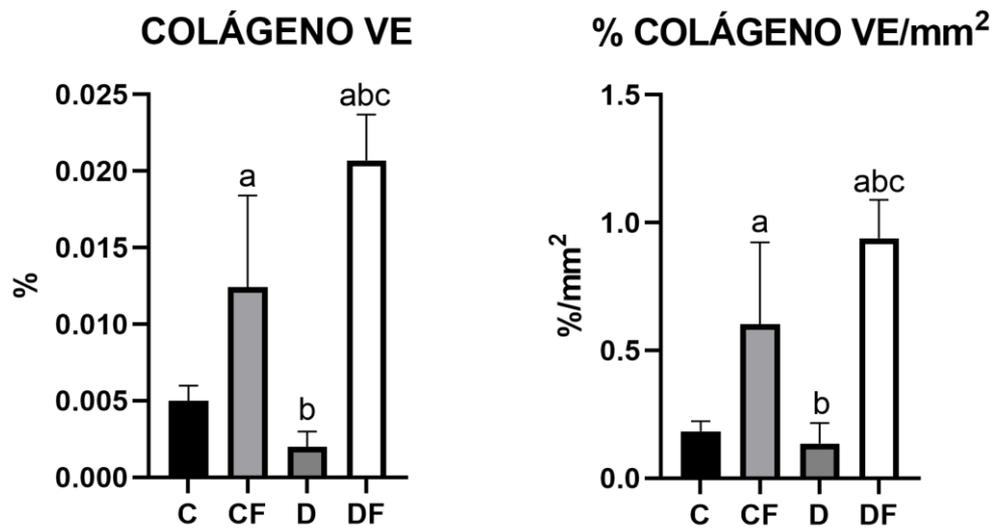
**Tabela 13:** Avaliação histológica dos ventrículos esquerdo e direito dos animais dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10).

	C	CF	D	DF
Área total do VE (mm <sup>2</sup> )	36,82 ± 6,02	49,40 ± 5,80 <sup>a</sup>	64,66 ± 11,67 <sup>ab</sup>	43,12 ± 4,68 <sup>c</sup>
% colágeno VE	0,0050 ± 0,001	0,0124 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,0020 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,0207 ± 0,003 <sup>abc</sup>
% colágeno VE/mm <sup>2</sup>	0,18 ± 0,04	0,60 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,94 ± 0,01 <sup>abc</sup>
Área total VD	8,38 ± 0,31	11,28 ± 3,84	12,29 ± 3,21	8,69 ± 2,67
% colágeno VD	0,0094 ± 0,001	0,0205 ± 0,009 <sup>a</sup>	0,0045 ± 0,0001 <sup>b</sup>	0,033 ± 0,004 <sup>abc</sup>

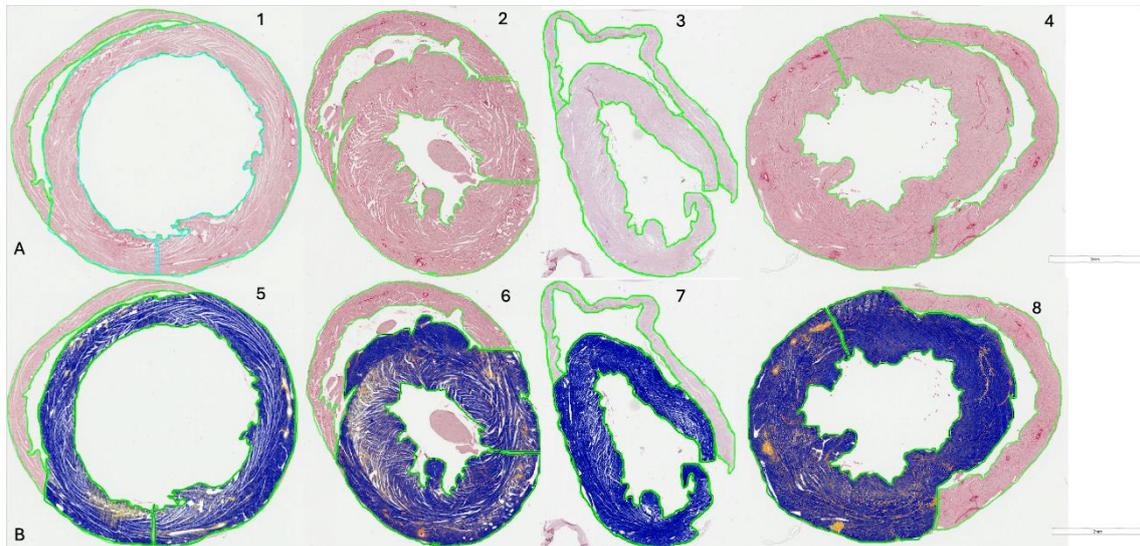
Tabela representativa das médias ± desvio padrão; <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo C; <sup>b</sup> p<0,05 em relação ao grupo CF; <sup>c</sup> p<0,05 em relação ao grupo D.



**Figura 21.** Colágeno total do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias ± DPM. <sup>a</sup> p<0,05 vs. C, <sup>b</sup> p<0,05 vs. CF e <sup>c</sup> p<0,05 vs. D.



**Figura 22.** Colágeno do ventrículo esquerdo (%) e porcentagem do colágeno do ventrículo esquerdo em mm<sup>2</sup> dos animais dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup> p<0,05 vs. C, <sup>b</sup> p<0,05 vs. CF e <sup>c</sup> p<0,05 vs. D.



**Figura 23.** Figura representativa dos cortes histológicos na linha A e das áreas totais de tecido ventricular esquerdo (azul) e colágeno (amarelo) na linha B, respectivamente dos grupos: controle (C – 1 e 5), controle frutose (CF – 2 e 6), diabético (D – 3 e 7), diabético frutose (DF 4 e 8) ao final do protocolo.

#### 4.8 Estresse oxidativo

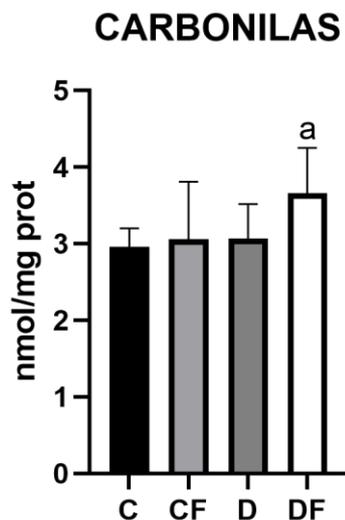
Na tabela 14 estão apresentadas as medidas de estresse oxidativo dos grupos C, CF, D e DF.

**Tabela 14:** Parâmetros de estresse oxidativo do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10).

	C	CF	D	DF
<b>Carbonilas</b> (nmol/mg proteína)	2,96 ± 0,24	3,06 ± 0,75	3,07 ± 0,45	3,66 ± 0,59 <sup>a</sup>
<b>TBARS</b> (μmol/mg proteína)	1,98 ± 0,57	1,71 ± 0,58	1,86 ± 0,88	2,37 ± 1,06
<b>Peróxido Hidrogênio</b> (μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2,86 ± 0,33	2,41 ± 0,41	2,60 ± 0,43	3,40 ± 0,64 <sup>bc</sup>
<b>NADPH oxidase</b> (nmol/min/mg proteína)	0,166 ± 0,02	0,144 ± 0,02	0,157 ± 0,05	0,215 ± 0,07 <sup>a,b,c</sup>
<b>CAT</b> (nmol/mg proteína)	0,83 ± 0,17	0,47 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,42	0,65 ± 0,10
<b>SOD</b> (USOD/mg proteína)	8,76 ± 1,32	6,79 ± 0,64 <sup>a</sup>	9,07 ± 0,89 <sup>b</sup>	4,75 ± 0,99 <sup>abc</sup>
<b>FRAP</b> (mM Fe(ii))	0,155 ± 0,049	0,059 ± 0,025 <sup>a</sup>	0,067 ± 0,024 <sup>ab</sup>	0,044 ± 0,014 <sup>ab</sup>

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros de estresse oxidativo; <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo C; <sup>b</sup> p<0,05 em relação ao grupo CF; <sup>c</sup> p<0,05 em relação ao grupo D.

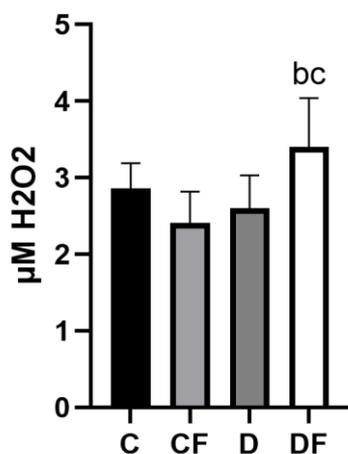
Na análise dos parâmetros de estresse oxidativo do tecido cardíaco, foi possível observar alterações entre os grupos, como apresentado na Tabela 14. Apesar de não ter sido observado diferenças na lipoperoxidação (TBARS), as carbonilas, um marcador de dano oxidativo a proteínas, foi maior no grupo DF em comparação ao grupo C, sugerindo aumento de estresse oxidativo proteico pela associação entre diabetes e consumo de frutose (Figura 24).



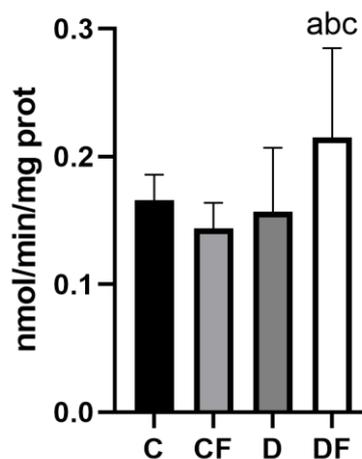
**Figura 24.** Oxidação de proteínas – Carbonilas no ventrículo esquerdo dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. C.

Os níveis de peróxido de hidrogênio também apresentaram elevação significativa no grupo DF em comparação aos grupos D e CF. A atividade da NADPH oxidase, associada à produção de ânion superóxido, estava aumentada no grupo DF em relação aos demais grupos avaliados (C, CF e D). Esses achados sugerem aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) quando ambas as condições metabólicas (DM e frutose) estavam presentes (Tabela 14 e Figura 25).

### PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

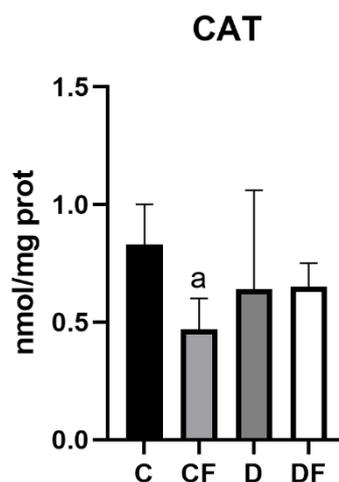


### NADPH Oxidase



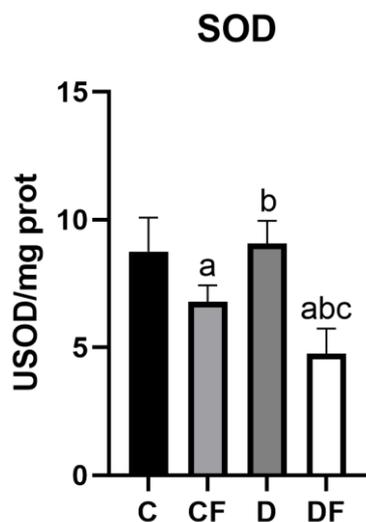
**Figura 25.** Concentração de peróxido de Hidrogênio e da atividade da NADPH dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. C, <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CF e <sup>c</sup>  $p < 0,05$  vs. D.

Com relação aos antioxidantes, a atividade da catalase (CAT), enzima antioxidante que catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio, apresentou-se reduzida no grupo CF em comparação ao grupo C, denotando prejuízo na capacidade antioxidante frente à sobrecarga de frutose (Tabela 14 e Figura 26).



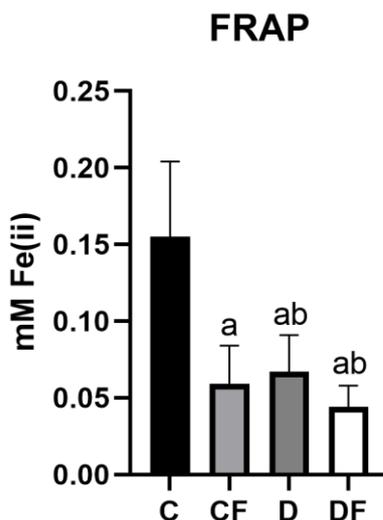
**Figura 26.** Atividade da enzima antioxidante Catalase no ventrículo esquerdo dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. C.

O grupo CF apresentou redução da atividade da SOD em relação aos grupos C e D. O grupo DF apresentou redução da SOD em relação a todos os demais grupos avaliados (C, CF e D) o que reforça a hipótese de prejuízo na defesa antioxidante endógena associada a presença de diabetes e consumo de frutose (Tabela 14 e Figura 27).



**Figura 27.** Atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. C, <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CF e <sup>c</sup>  $p < 0,05$  vs. D.

A FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), que é representativa da capacidade antioxidante não enzimática, foi menor nos grupos CF, D e DF em comparação ao grupo C. Sendo o grupo DF o que apresentou a maior redução (DF vs. C e CF), demonstrando um maior comprometimento da capacidade antioxidante total não enzimática em animais diabéticos que consumiram frutose (Tabela 14, Figura 28).



**Figura 28.** Capacidade antioxidante da enzima FRAP no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos: controle (C, n=10), controle frutose (CF, n=10), diabético (D, n=10), diabético frutose (DF, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. C, <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CF.

## 5.2 Efeitos da Piridostigmina no DM

### 5.2.1 Avaliações Metabólicas

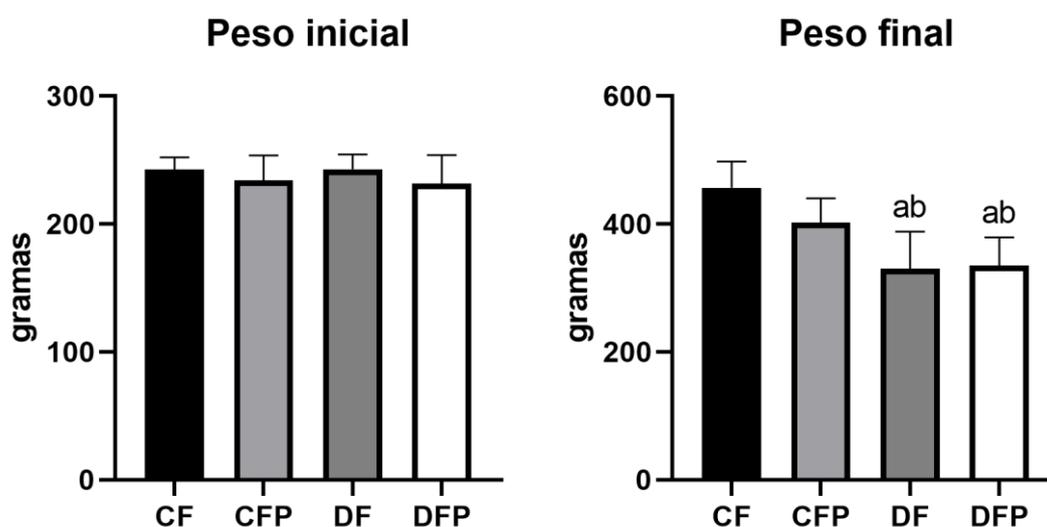
#### 5.2.1.1 Peso corporal

A Tabela 15 apresenta os dados de peso corporal dos animais nos momentos inicial e final do protocolo. No início do estudo, os pesos corporais foram semelhantes entre os grupos. Ao final do protocolo foi possível observar o aumento do peso corporal entre todos os grupos: no entanto, os grupos DF e DFP exibiram redução de peso em comparação ao grupo CF (Figura 29).

**Tabela 15** – Peso corporal dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10); diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) no início e no final do protocolo.

<b>Peso (g)</b>	<b>Inicial</b>	<b>Final</b>
<b>CF</b>	242,5 ± 9,5	456,9 ± 40,6
<b>CFP</b>	234,1 ± 19,4	402,0 ± 38,2
<b>DF</b>	242,8 ± 11,5	330,2 ± 57,8 <sup>ab</sup>
<b>DFP</b>	231,7 ± 22,0	335,3 ± 43,73 <sup>ab</sup>

Dados representam média ± DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo CF no mesmo momento; <sup>b</sup> p<0,05 em relação ao grupo CFP no mesmo momento.



**Figura 29.** Peso corporal dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10). Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. CF, <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CFP, no início e final do protocolo.

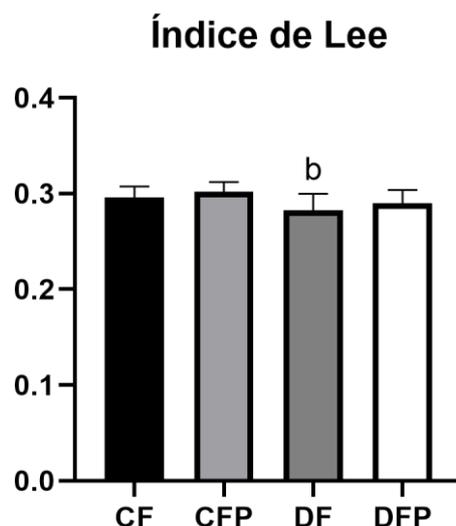
### 5.2.1.2 Índice de massa corpórea (Índice de Lee)

Notou-se uma redução do índice de massa corpórea no grupo DF em relação ao grupo CFP (Tabela 16 e Figura 30).

**Tabela 16** – Índice de Lee dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10); diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10).

	CF	CFP	DF	DFP
<b>Lee</b>	0,296 $\pm$ 0,001	0,302 $\pm$ 0,01	0,282 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,289 $\pm$ 0,01

Dados representam média  $\pm$  DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo CFP.



**Figura 30.** Índice de Lee dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10). Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CFP.

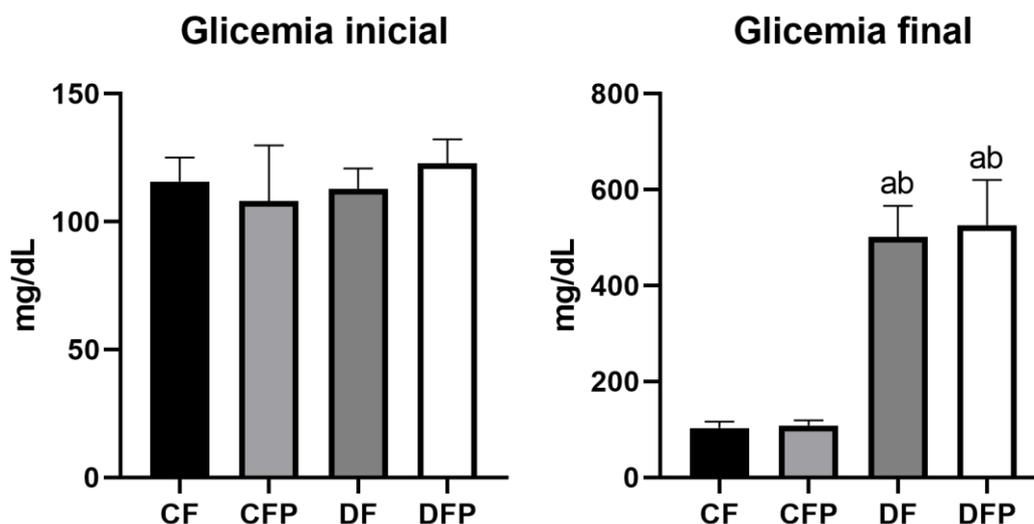
### 5.2.1.3 Glicemia e Triglicerídeos

No início do protocolo, não foram observadas diferenças significativas nos níveis glicêmicos entre os grupos. Ao final do estudo, os grupos diabéticos (DF e DFP) apresentaram elevação significativa da glicemia, tanto em relação aos seus respectivos valores basais quanto aos grupos controle (CF e CFP), conforme demonstrado nas Tabelas 17 e 18 (Figuras 31 e 32).

**Tabela 17** – Glicemia dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10); diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) no início e final do protocolo.

		<b>Inicial</b>	<b>Final</b>
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	<b>CF</b>	115,7 $\pm$ 9,3	102,8 $\pm$ 13,7
	<b>CFP</b>	108,0 $\pm$ 21,8	108,5 $\pm$ 10,3
	<b>DF</b>	112,9 $\pm$ 7,9	508,8 $\pm$ 41,4 <sup>ab</sup>
	<b>DFP</b>	122,8 $\pm$ 9,3	447,6 $\pm$ 78,4 <sup>ab</sup>

Dados representam média  $\pm$  DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo CF no mesmo momento; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo CFP no mesmo momento.

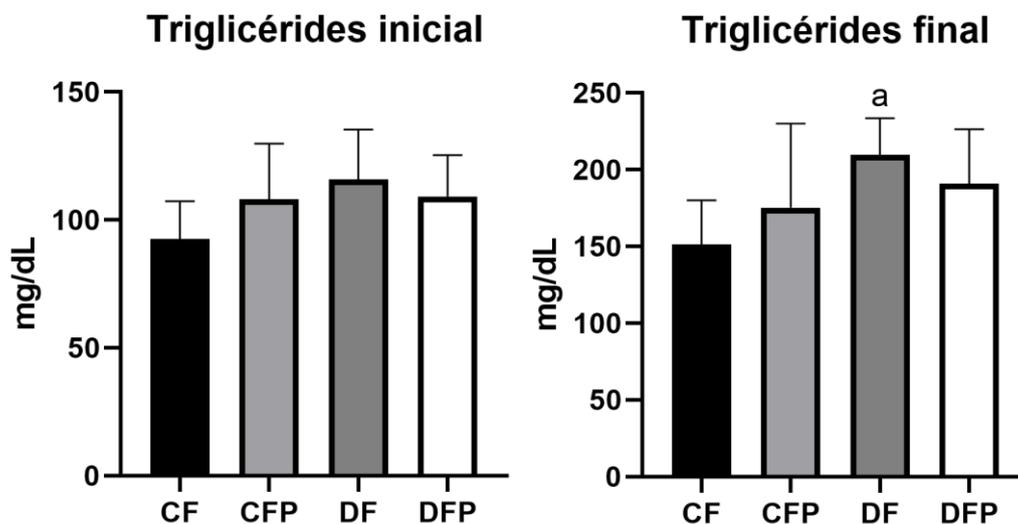


**Figura 31.** Glicemia dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10). Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. CF e <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CFP.

**Tabela 18** – Triglicerídeos sanguíneos dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10); diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) no final do protocolo.

		Inicial	Final
<b>Triglicerídeos</b> (mg/dL)	<b>CF</b>	92,5 $\pm$ 14,8	151,4 $\pm$ 28,6
	<b>CFP</b>	108,0 $\pm$ 21,8	175,4 $\pm$ 54,7
	<b>DF</b>	115,8 $\pm$ 19,5	209,8 $\pm$ 23,9 <sup>a</sup>
	<b>DFP</b>	109,2 $\pm$ 16,1	191,0 $\pm$ 35,4

Dados representam média  $\pm$  DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo CF no mesmo momento.



**Figura 32.** Triglicerídeos sanguíneos dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10). Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. CF no mesmo momento.

#### 5.2.1.4 Teste de tolerância à insulina (ITT)

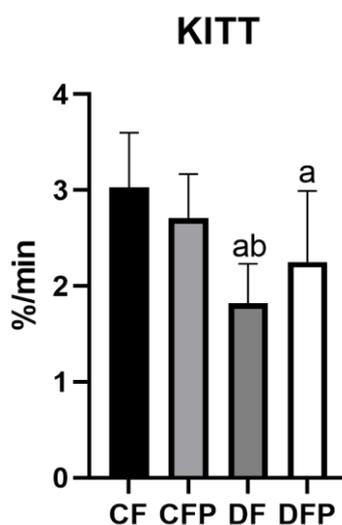
Os resultados do teste de tolerância a insulina (ITT) estão apresentados na tabela 19.

**Tabela 19** – Constante de decaimento da glicose (KITT) nos animais dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10); diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10), no final do protocolo.

	CF	CFP	DF	DFP
<b>KITT</b> (%/min)	3,03 $\pm$ 0,57	2,71 $\pm$ 0,46	1,82 $\pm$ 0,41 <sup>ab</sup>	2,25 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>

Dados representam média  $\pm$  DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo CF; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação ao grupo CFP.

O grupo DF apresentou redução do KITT (constante de decaimento da glicose) em relação aos grupos CF e CFP. Os animais do grupo DFP apresentaram uma melhora parcial da resistência a insulina no KITT quando comparados ao grupo CF, porém sem alcançar os mesmos níveis (Figura 33).



**Figura 33.** Constante de decaimento da glicose (KITT) no teste de tolerância à insulina (ITT) dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10). Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. CF e <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CFP.

## 6.2.2 Avaliações Ecocardiográficas

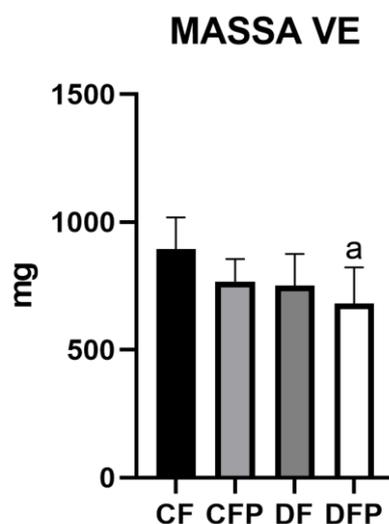
### 6.2.2.1 Morfometria cardíaca

Em relação aos parâmetros morfométricos nota-se a redução da massa do VE no grupo DFP em relação ao grupo CF e a redução da espessura diastólica da parede posterior do VE no grupo DF em relação ao grupo CFP (Tabela 20, Figuras 34 e 35).

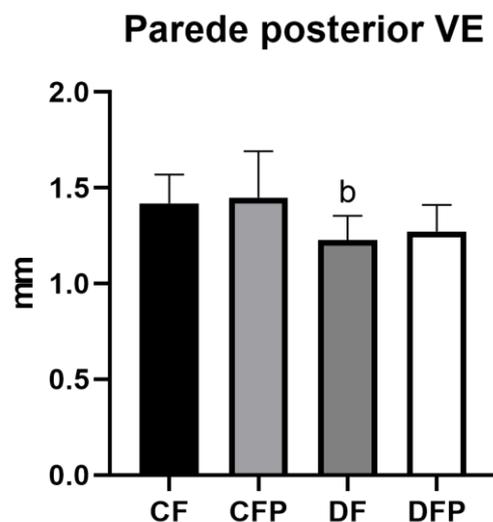
**Tabela 20** – Parâmetros morfométricos do ventrículo esquerdo dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10); diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. VE = Ventrículo Esquerdo.

<b>Avaliações</b>	<b>CF</b>	<b>CFP</b>	<b>DF</b>	<b>DFP</b>
<b>Ecocardiográficas</b>				
<b>Massa VE (mg)</b>	894±124	767±89	750±126	681±142 <sup>a</sup>
<b>Diâmetro diastólico (mm)</b>	8,51 ± 0,60	8,12 ± 0,96	8,09 ± 0,42	7,92 ± 0,76
<b>Diâmetro sistólico (mm)</b>	5,67 ± 0,59	5,33± 0,80	5,33± 0,57	5,29 ± 0,74
<b>Espessura da parede anterior – diástole (mm)</b>	1,41 ± 0,18	1,39 ± 0,10	1,33 ± 0,20	1,32 ± 0,18
<b>Espessura da parede posterior – diástole (mm)</b>	1,41 ± 0,15	1,44 ± 0,24	1,22 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,27 ± 0,13

Dados representam média ± DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo C e; <sup>b</sup> p<0,05 em relação ao grupo CF.



**Figura 34.** Massa do ventrículo esquerdo dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias ± DPM. <sup>a</sup> p<0,05 vs. CF.



**Figura 35.** Espessura da parede posterior em diástole do ventrículo esquerdo dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CFP.

### 5.2.2.2 Função cardíaca

Em relação a função sistólica não se observou diferença entre os grupos analisados (Tabela 21).

**Tabela 21**– Função sistólica do ventrículo esquerdo dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10); diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo.

<b>Avaliações</b>	<b>CF</b>	<b>CFP</b>	<b>DF</b>	<b>DFP</b>
<b>Ecocardiográficas</b>				
<b>Fração de Ejeção (%)</b>	59,67 $\pm$ 6,3	61,33 $\pm$ 7,2	59,54 $\pm$ 9,3	59,59 $\pm$ 8,5
<b>Fração de Encurtamento (%)</b>	33,30 $\pm$ 4,6	34,46 $\pm$ 5,4	33,29 $\pm$ 6,4	33,20 $\pm$ 6,4
<b>Onda S'</b>	44,73 $\pm$ 4,5	46,78 $\pm$ 5,3	44,63 $\pm$ 4,8	43,32 $\pm$ 6,0

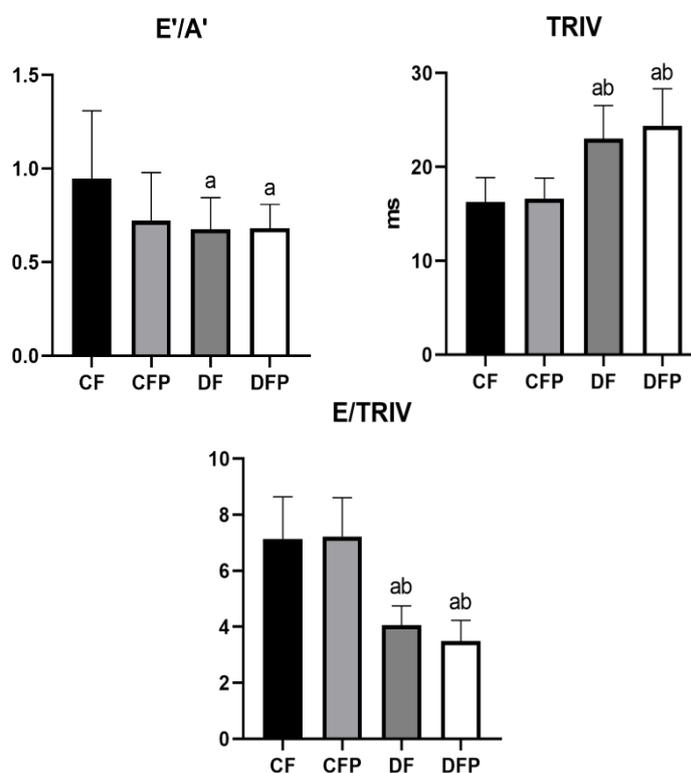
Dados representam média  $\pm$  DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey.

É possível notar presença de disfunção diastólica nos grupos DF e DFP, devido a um decréscimo na relação E'/A' associada a um aumento do TRIV, quando comparado ao grupo CF. Nota-se ainda redução da relação E/TRIV nos grupos DF e DFP quando comparados aos grupos CF e CFP (Tabela 22 e Figuras 36).

**Tabela 22** – Função diastólica do ventrículo esquerdo dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10); diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo.

Avaliações	CF	CFP	DF	DFP
<b>Ecocardiográficas</b>				
<b>Relação E/A</b>	1,61 ± 0,39	1,54 ± 0,21	1,53 ± 0,34	1,67 ± 0,37
<b>Relação E'/A'</b>	0,94 ± 0,36	0,72 ± 0,25	0,67 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,12 <sup>a</sup>
<b>TRIV (ms)</b>	16,26 ± 2,59	16,62 ± 2,20	23,02 ± 3,50 <sup>ab</sup>	24,38 ± 3,94 <sup>ab</sup>
<b>E/TRIV</b>	7,14 ± 1,50	7,22 ± 1,37	4,06 ± 0,68 <sup>ab</sup>	3,48 ± 0,74 <sup>ab</sup>

Dados representam média ± DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo CF e <sup>b</sup> p<0,05 em relação ao grupo CFP.



**Figura 36.** Função diastólica do ventrículo esquerdo dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias ± DPM. <sup>a</sup> p<0,05 vs. CF e <sup>b</sup> p<0,05 vs. CFP.

### 5.2.3 Pressão Arterial e Frequência cardíaca

Os dados obtidos durante o Registro da Pressão Arterial direta e frequência cardíaca estão mostrados na Tabela 23.

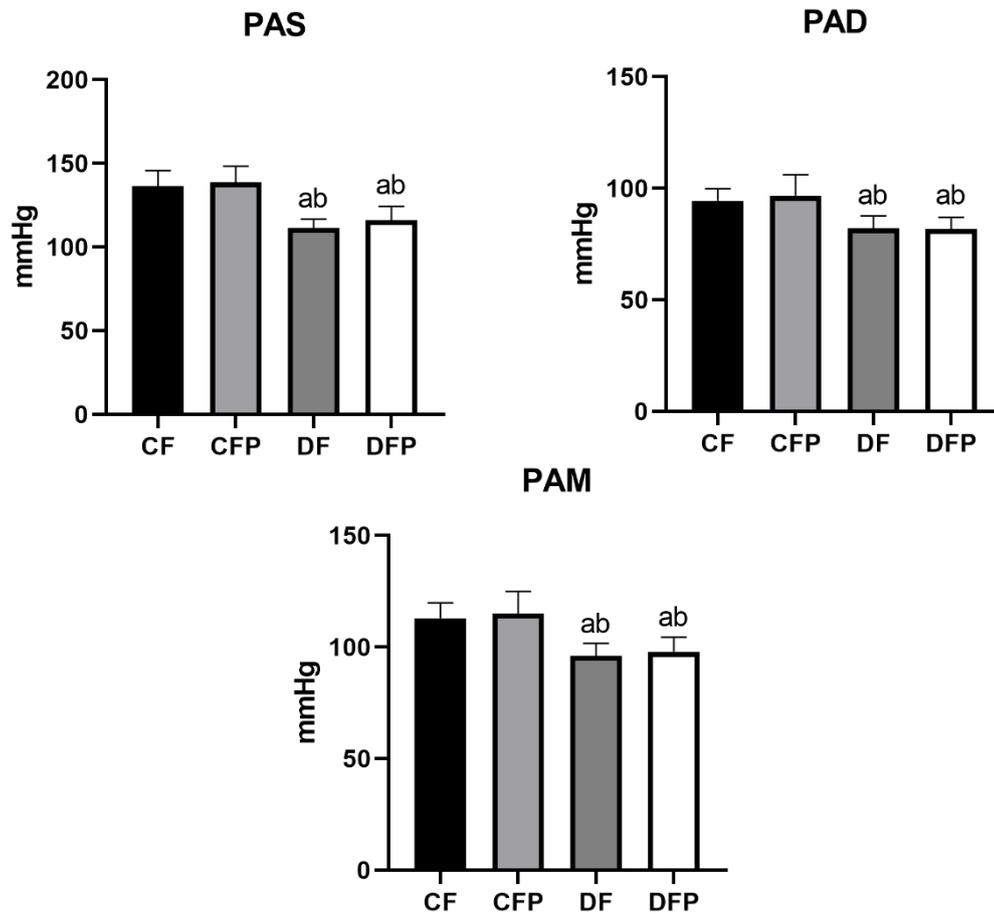
**Tabela 23** – Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10); diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo.

	CF	CFP	DF	DFP
<b>PAS (mmHg)</b>	136,5±9,2	138,7 ± 9,7	111,3 ± 5,4 <sup>ab</sup>	116,1 ± 8,4 <sup>ab</sup>
<b>PAD (mmHg)</b>	94,39 ± 5,4	96,70 ± 9,33	82,08 ± 5,6 <sup>ab</sup>	81,86 ± 5,1 <sup>ab</sup>
<b>PAM (mmHg)</b>	112,9 ± 6,9	115,1 ± 9,8	96,09 ± 5,5 <sup>ab</sup>	97,98 ± 6,4 <sup>ab</sup>
<b>PP (mmHg)</b>	42,06 ± 4,6	42,04 ± 4,0	29,27 ± 3,3 <sup>ab</sup>	34,21 ± 5,4 <sup>abc</sup>
<b>FC (bpm)</b>	343,1 ± 27,4	346,1 ± 26,9	265,3± 30,4 <sup>ab</sup>	275,1± 13,2 <sup>ab</sup>

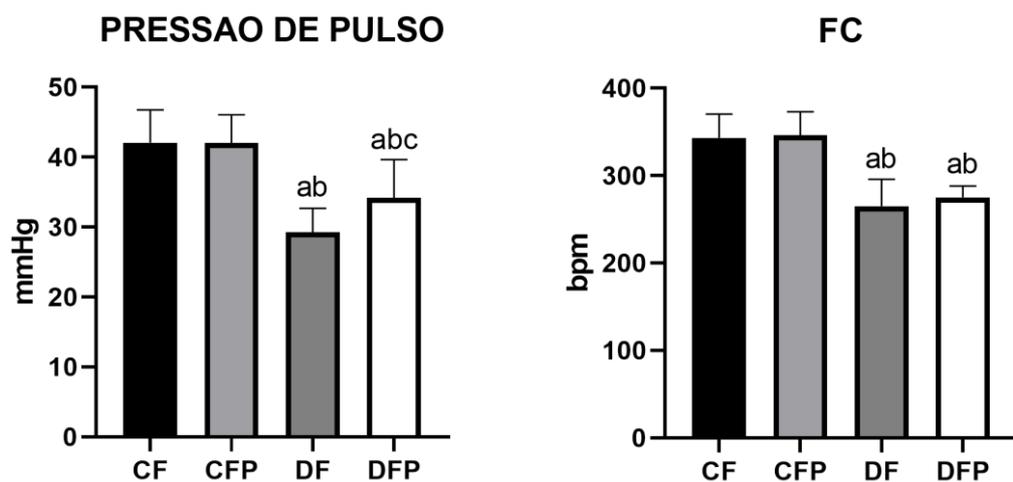
Dados representam média ± DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo C; <sup>b</sup> p<0,05 em relação ao grupo CF; <sup>c</sup> p<0,05 em relação ao grupo D.

É possível observar que a PAS, PAD, PP e a PAM estavam reduzida nos grupos diabéticos (DF e DFP) quando se compara com o grupo CF e CFP. Contudo, o uso de piridostigmina no grupo DFP foi capaz de atenuar a redução da PP em relação ao grupo DF (Figura 37).

Também, a FC apresentou-se diminuída nos grupos diabéticos (DF e DFP) em relação aos grupos controle (CF e CFP) (Figura 38).



**Figura 37.** Pressão arterial sistólica (PAS), Pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM) dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. CF e <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CFP.



**Figura 38.** Pressão de pulso (PP) e Frequência cardíaca (FC) dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. CF, <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CFP e <sup>c</sup>  $p < 0,05$  vs. DF.

### 5.2.4 Sensibilidade barorreflexa

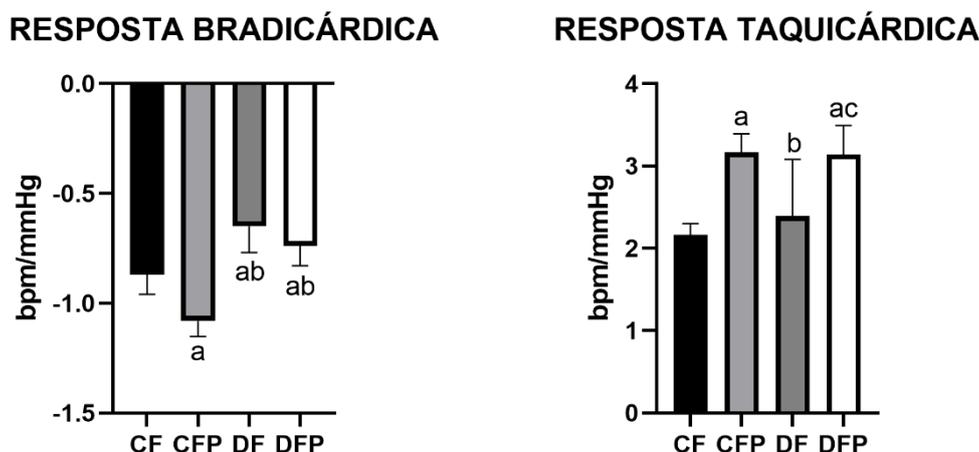
Os dados de sensibilidade dos barorreceptores estão descritos na Tabela 24.

**Tabela 24** – Sensibilidade dos Pressorreceptores dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10); diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo.

	CF	CFP	DF	DFP
<b>Resposta</b>				
<b>Bradicárdica</b> (bpm/mmHg)	-0,87 ± 0,09	-1,08 ± 0,07 <sup>a</sup>	-0,65 ± 0,12 <sup>ab</sup>	-0,74 ± 0,09 <sup>ab</sup>
<b>Resposta</b>				
<b>Taquicárdica</b> (bpm/mmHg)	2,16 ± 0,14	3,17 ± 0,22 <sup>a</sup>	2,39 ± 0,69 <sup>b</sup>	3,14 ± 0,35 <sup>ac</sup>

Dados representam média ± DPM e as análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguido de post-hoc Tukey. <sup>a</sup> p<0,05 em relação ao grupo C e <sup>b</sup> p<0,05 em relação ao grupo CF.

O grupo CFP demonstrou um aumento na resposta bradicárdica induzida por aumento da PA quando comparado ao grupo CF, no entanto, os grupos diabéticos (DF e DFP) apresentaram redução da bradicárdica em relação aos grupos CF e CFP. Na resposta taquicárdica da sensibilidade barorreflexa, induzida por queda da PA, observou-se aumento nos grupos tratados com piridostigmina (CFP e DFP) em relação aos grupos CF e DF (Figura 39).



**Figura 39.** Sensibilidade Barorreflexa dos grupos: dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias ± DPM. <sup>a</sup> p<0,05 vs. CF, <sup>b</sup> p<0,05 vs. CFP e <sup>c</sup> p<0,05 vs. DF

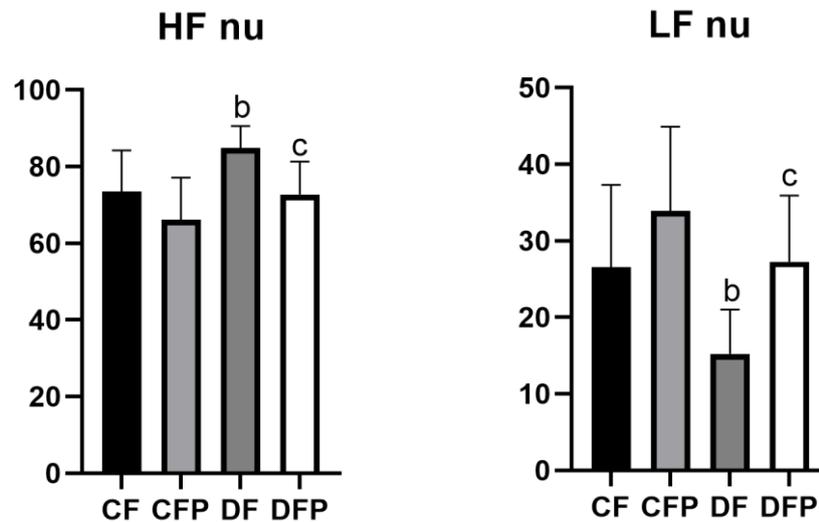
### 5.2.5 Análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC)

Podemos notar que o grupo CFP apresentou aumento do DP IP em relação aos grupos CF e DF. Na Var IP o grupo CFP e DFP apresentaram aumento significativo quando comparado aos grupos CF e DFP, respectivamente, e o grupo DF teve diminuição do parâmetro comparado ao grupo CFP. No grupo CFP, observamos aumento dos parâmetros LF IP em relação aos demais grupos avaliados. O HF IP do grupo CFP também foi aumentado em relação ao grupo CF. O LF (nu) foi diminuído e o HF (un) aumentado do grupo DF em relação aos grupos CFP e DFP. O balanço simpato vagal (LF/HF) mostrou-se diminuído no grupo DF quando comparado aos grupos CFP e DFP (Tabela 25 e Figuras 40, 41 e 42).

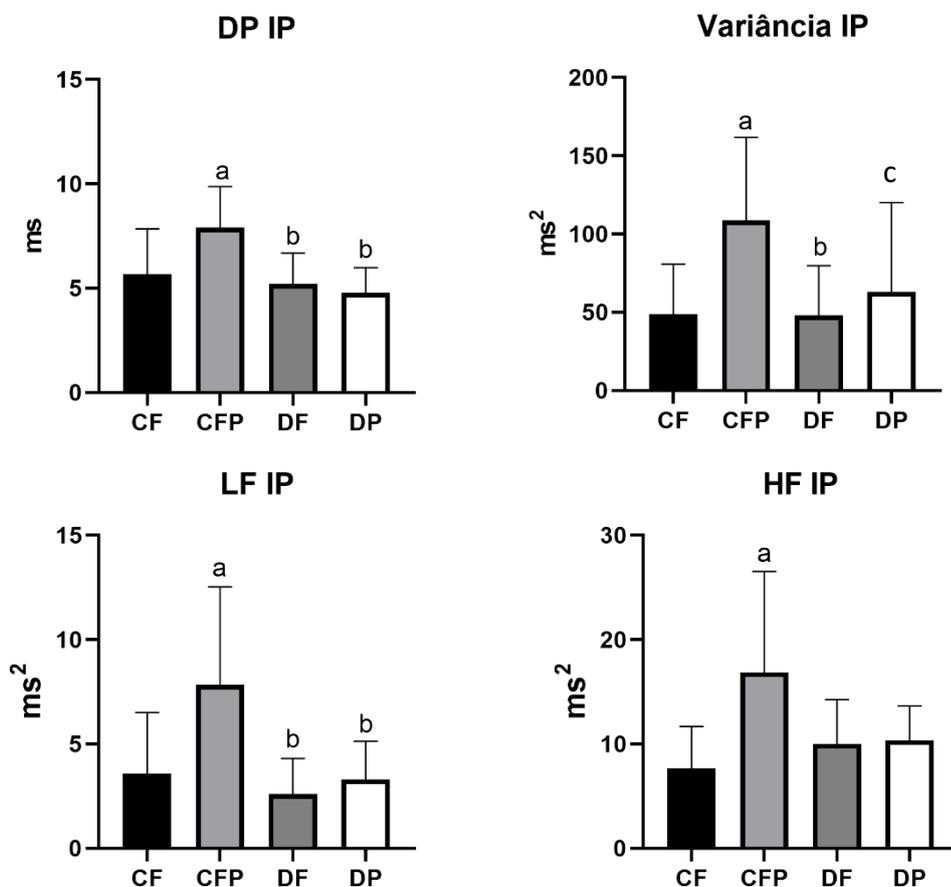
**Tabela 25** – Índices de variabilidade da frequência cardíaca dos animais dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10); diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10).

	CF	CFP	DF	DFP
<b>DP IP (ms)</b>	5,66 ± 2,17	7,90 ± 1,96 <sup>a</sup>	5,20 ± 1,47 <sup>b</sup>	7,05 ± 1,66
<b>Var IP (ms<sup>2</sup>)</b>	45,94 ± 19,53	108,69 ± 39,56 <sup>a</sup>	40,34 ± 20,89 <sup>b</sup>	75,96 ± 19,67 <sup>c</sup>
<b>RMSSD (ms)</b>	5,66 ± 1,97	7,48 ± 1,86	6,63 ± 1,67	6,14 ± 0,90
<b>LF IP (ms<sup>2</sup>)</b>	3,56 ± 2,94	7,82 ± 4,70 <sup>a</sup>	3,60 ± 1,70 <sup>b</sup>	3,30 ± 1,81 <sup>b</sup>
<b>HF IP (ms<sup>2</sup>)</b>	7,63 ± 4,04	16,85 ± 9,69 <sup>a</sup>	10,01 ± 4,21	10,36 ± 3,27
<b>LF (nu)</b>	26,56 ± 10,75	33,89 ± 11,01	15,22 ± 5,80 <sup>b</sup>	27,29 ± 8,60 <sup>c</sup>
<b>HF (nu)</b>	73,44 ± 10,75	66,11 ± 11,01	84,78 ± 5,80 <sup>b</sup>	72,71 ± 8,60 <sup>c</sup>
<b>LF/HF</b>	0,43 ± 0,26	0,60 ± 0,17	0,19 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,43 ± 0,10 <sup>c</sup>
<b>0V (%)</b>	23,77 ± 12,96	28,23 ± 9,17	18,40 ± 8,62	21,29 ± 6,38
<b>1V (%)</b>	39,88 ± 3,94	40,44 ± 3,57	38,66 ± 7,08	38,87 ± 3,62
<b>2V (%)</b>	31,51 ± 9,69	27,41 ± 5,10	39,03 ± 12,20 <sup>b</sup>	35,92 ± 5,18

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros de variabilidade da Frequência Cardíaca. DP IP (ms): Desvio Padrão do Intervalo de pulso; Var IP (ms<sup>2</sup>): Variância do Intervalo de Pulso; RMSSD (ms): Raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças dos intervalos de pulso consecutivos; LF IP: Modulação de baixa frequência absoluto (ms<sup>2</sup>) e normalizado (un); HF IP: Modulação de alta frequência absoluto (ms<sup>2</sup>) e normalizado (un); Power total: potência total do sinal; LF/HF IP: Balanço simpato-vagal; 0V (%): zero variação; 1V (%): uma variação; 2V: duas variações. <sup>a</sup> p<0,05 vs. CF, <sup>b</sup> p<0,05 vs. CFP e <sup>c</sup> p<0,05 vs. DF

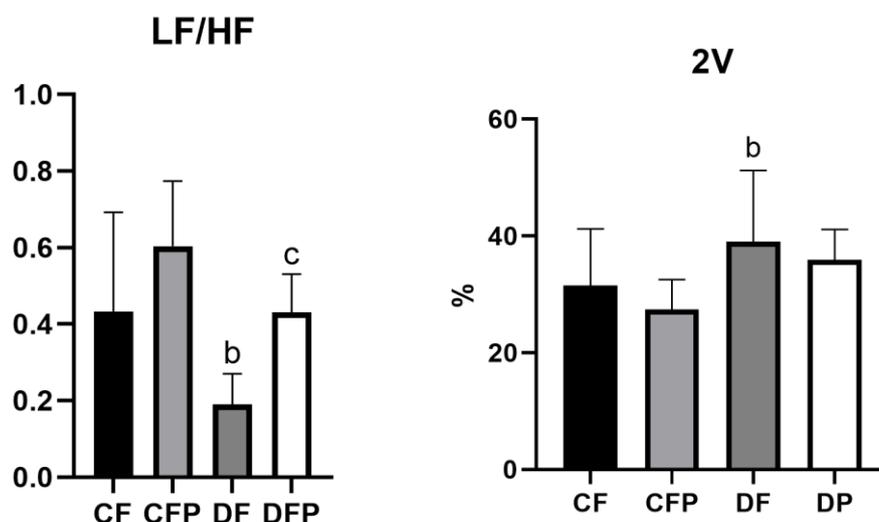


**Figura 40.** LF IP: Modulação de baixa frequência normalizado (un); HF IP: Modulação de alta frequência normalizado (un) dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridotigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CFP e <sup>c</sup>  $p < 0,05$  vs. DF.



**Figura 41.** Desvio Padrão do Intervalo de pulso (DP IP), Variância do Intervalo de Pulso ( $ms^2$ ) (Var IP), Modulação de baixa frequência absoluto ( $ms^2$ ) (LF IP) e Modulação de alta frequência absoluto ( $ms^2$ ) (HF IP) dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridotigmina (CFP, n=10), diabético

frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup> p<0,05 vs. CF, <sup>b</sup> p<0,05 vs. CFP.



**Figura 42.** Balanço simpato-vagal (LF/HF IP), duas variações (2V) dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>b</sup> p<0,05 vs. CFP e <sup>c</sup> p<0,05 vs. DF.

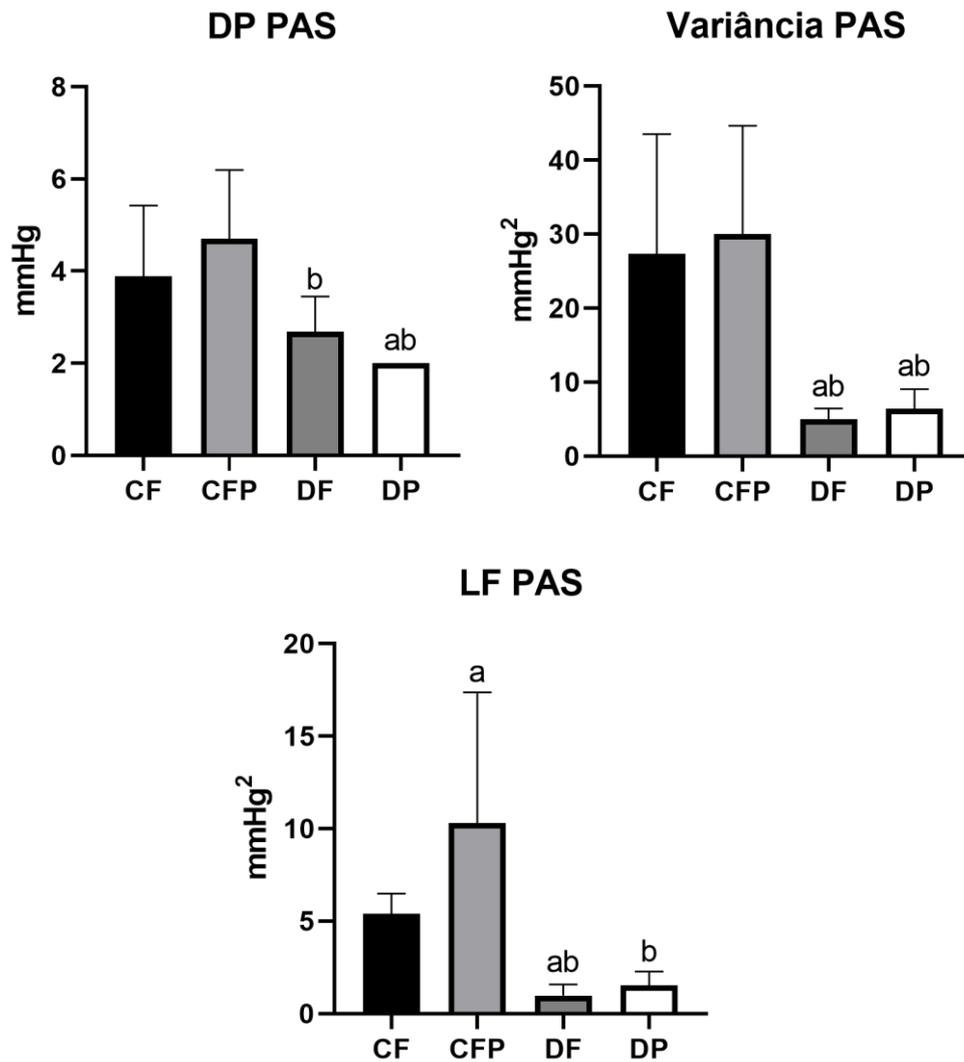
### 5.2.6 Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica

Observamos importante redução da Var PAS nos grupos diabéticos (DF e DFP) em relação aos grupos controles (CF e CFP). Ainda, pode-se notar elevação componente simpático da modulação da PAS no grupo CFP em relação ao grupo CF e redução nos grupos DF e DFP em relação ao grupo CFP (Tabela 26 e Figura 43).

**Tabela 26** – Índices de variabilidade da pressão arterial sistólica dos animais dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10); diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10).

	CF	CFP	DF	DFP
<b>DP PAS (mmHg)</b>	3,89 $\pm$ 1,53	4,70 $\pm$ 1,49	2,68 $\pm$ 0,77 <sup>b</sup>	2,48 $\pm$ 0,50 <sup>ab</sup>
<b>Var PAS (mmHg<sup>2</sup>)</b>	27,29 $\pm$ 16,21	30,03 $\pm$ 14,62	4,98 $\pm$ 1,47 <sup>ab</sup>	6,39 $\pm$ 2,68 <sup>ab</sup>
<b>LF PAS (mmHg<sup>2</sup>)</b>	5,93 $\pm$ 1,09	10,29 $\pm$ 7,08 <sup>a</sup>	0,97 $\pm$ 0,60 <sup>ab</sup>	1,53 $\pm$ 0,74 <sup>b</sup>

Tabela representativa das médias  $\pm$  desvio padrão da média dos parâmetros de variabilidade da Pressão arterial sistólica. DP PAS (mmHg): Desvio Padrão da pressão arterial sistólica; Var PAS (mmHg<sup>2</sup>): Variância da pressão arterial sistólica; LF PAS: Modulação de baixa frequência da pressão arterial sistólica (mmHg<sup>2</sup>); <sup>a</sup> p<0,05 vs. CF e <sup>b</sup> p<0,05 vs CFP.



**Figura 43.** DP PAS (mmHg): Desvio Padrão da pressão arterial sistólica; Var PAS (mmHg<sup>2</sup>): Variância da pressão arterial sistólica; LF PAS: Modulação de baixa frequência da pressão arterial sistólica (mmHg<sup>2</sup>), dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. CF e <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CFP.

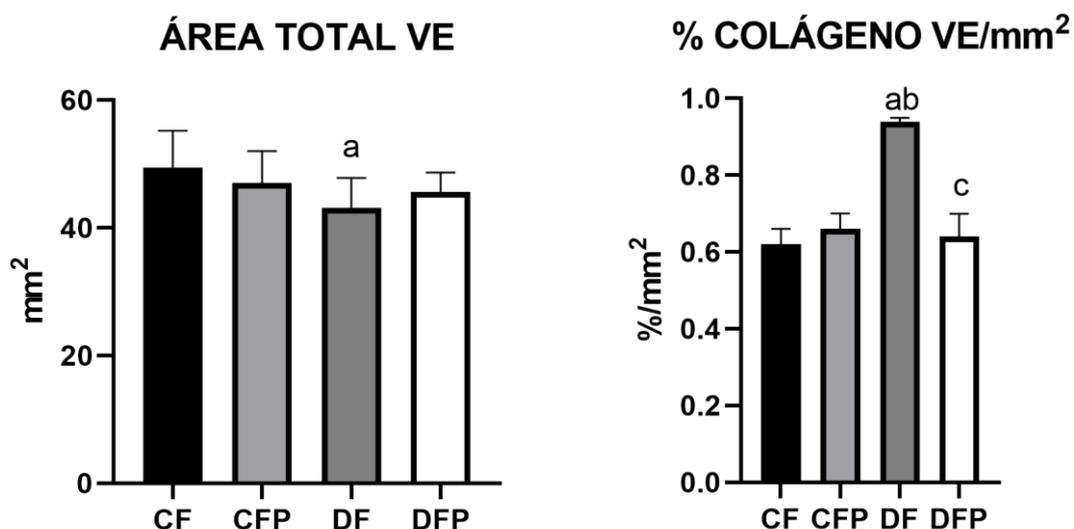
### 5.2.7 Quantificação do colágeno em tecido cardíaco

A área total do VE apresentou-se reduzida no grupo DF em comparação ao grupo CF. Além disso, observou-se um aumento expressivo na porcentagem total de colágeno no VE do grupo DF em comparação aos demais grupos avaliados (CF, CFP e DFP) conforme demonstrado na Tabela 27 e nas Figuras 44 e 45. Não houve alterações significativas no VD para os parâmetros avaliados.

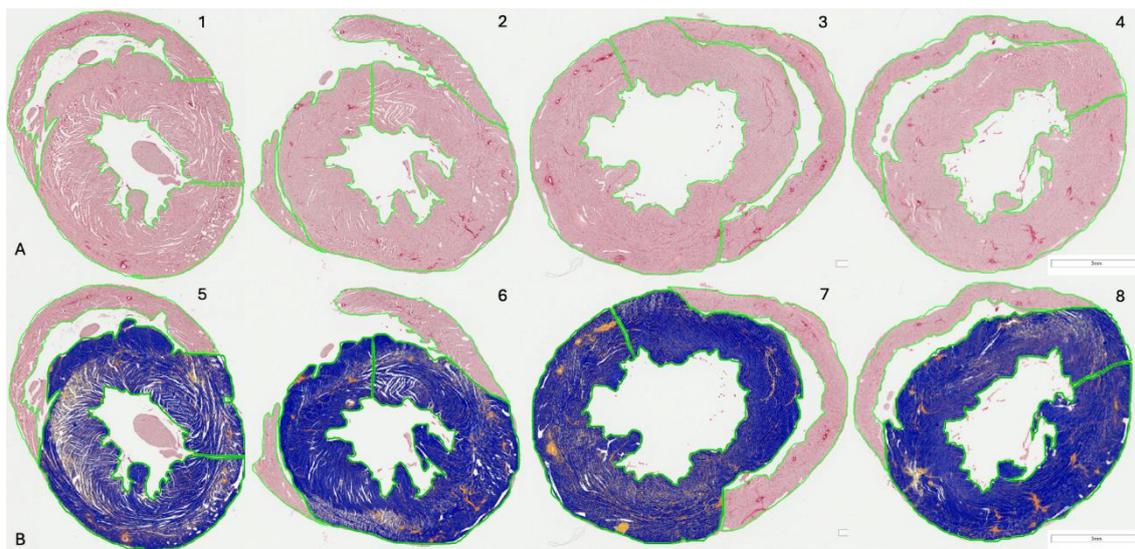
**Tabela 27** – Avaliação histológica dos ventrículos esquerdo e direito dos animais dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10); diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10).

	CF	CFP	DF	DFP
Área total do VE (mm <sup>2</sup> )	49,40 ± 5,80	47,03 ± 4,99	43,12 ± 4,68 <sup>a</sup>	45,63 ± 3,02
% colágeno VE	0,0124 ± 0,006	0,0139 ± 0,008	0,0207 ± 0,003	0,0138 ± 0,007
% colágeno VE/mm <sup>2</sup>	0,62 ± 0,04	0,66 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,64 ± 0,06 <sup>c</sup>
Área total VD	11,28 ± 3,84	11,16 ± 3,16	8,69 ± 2,67	10,07 ± 3,86
% colágeno VD	0,0205 ± 0,009	0,0228 ± 0,014	0,033 ± 0,004	0,0231 ± 0,013

Tabela representativa das médias ± desvio padrão do colágeno no músculo cardíaco. <sup>a</sup> p<0,05 vs. CF.



**Figura 44.** Colágeno total do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias ± DPM. <sup>a</sup> p<0,05 vs. C e <sup>b</sup> p<0,05 vs. CFP e <sup>c</sup> p<0,05 vs. DF



**Figura 45.** Figura representativa dos cortes histológicos na linha A e das áreas totais de tecido ventricular esquerdo (azul) e colágeno (amarelo) na linha B, respectivamente dos grupos: controle frutose (CF – 1 e 5), controle frutose + piridostigmina (CFP – 2 e 6), diabético frutose (DP – 3 e 7), diabético frutose + piridostigmina (DFP 4 e 8) ao final do protocolo.

### 6.2.8 Estresse oxidativo

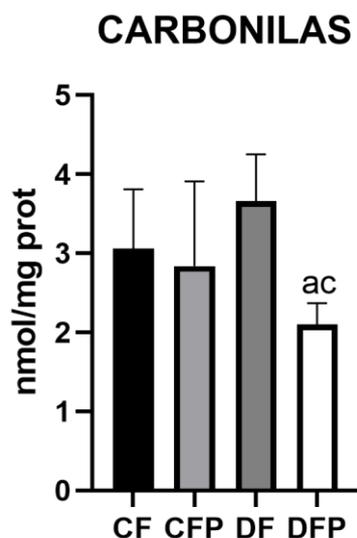
Na tabela 28 estão apresentadas as medidas de estresse oxidativo dos grupos CF, CFP, DF e DFP.

**Tabela 28** –Parâmetros de estresse oxidativo do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10); diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10).

	<b>CF</b>	<b>CFP</b>	<b>DF</b>	<b>DFP</b>
<b>Carbonilas</b> (nmol/mg proteína)	3,06 ± 0,75	2,84 ± 1,07	3,66 ± 0,59	2,10 ± 0,27 <sup>ac</sup>
<b>TBARS</b> (µmol/mg proteína)	1,71 ± 0,58	1,13 ± 0,21	2,37 ± 1,07	1,29 ± 0,20 <sup>c</sup>
<b>Peróxido Hidrogênio</b> (µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2,39 ± 0,44	2,29 ± 0,46	3,36 ± 0,62 <sup>ab</sup>	2,86 ± 0,69
<b>NADPH oxidase</b> (nmol/min/mg proteína)	0,143 ± 0,02	0,136 ± 0,01	0,215 ± 0,08 <sup>ab</sup>	0,133 ± 0,02 <sup>c</sup>
<b>CAT</b> (nmol/mg proteína)	0,44 ± 0,09	0,62 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,08 <sup>a</sup>
<b>SOD</b> (USOD/mg proteína)	6,71 ± 0,90	6,07 ± 0,61	4,75 ± 1,00 <sup>a,b</sup>	6,69 ± 0,70 <sup>c</sup>
<b>FRAP</b> (mM Fe(ii))	0,059 ± 0,024	0,074 ± 0,014	0,044 ± 0,015	0,042 ± 0,025

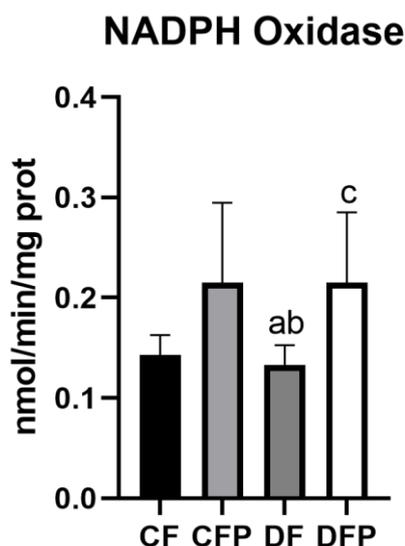
Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros de estresse oxidativo; <sup>a</sup> p<0,05 vs CF, <sup>b</sup> p<0,05 vs CFP, <sup>c</sup> p<0,05 vs. DF.

Com relação ao dano oxidativo, a oxidação de proteínas avaliada pela técnica de carbonilas, foi maior nos grupos CF e DF em comparação ao grupo DFP. A lipoperoxidação, avaliada por TBARS, foi mais elevada no grupo DF em relação ao grupo DFP (Figura 46).

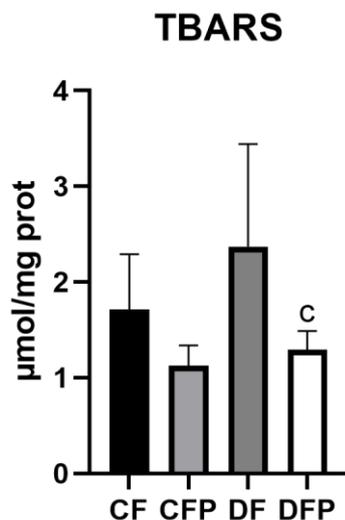


**Figura 46.** Oxidação de proteínas – Carbonilas no ventrículo esquerdo dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. C e <sup>c</sup>  $p < 0,05$  vs. DF.

Os níveis de peróxido de hidrogênio, um pró-oxidante, estavam elevados no grupo DF em comparação ao grupo CF e CFP, o que não foi observado no grupo DFP. A atividade da NADPH oxidase, uma enzima associada à produção de ânion superóxido, foi maior no grupo DF em comparação aos demais grupos (Figura 47 e 48).



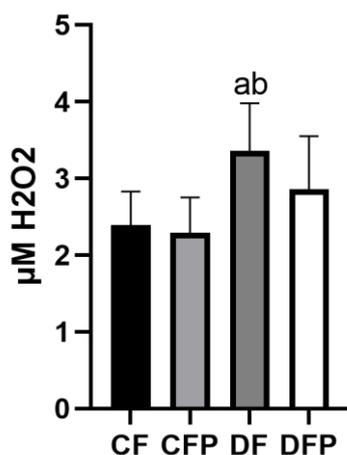
**Figura 47.** Atividade da NADPH dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. CF, <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CFP e <sup>c</sup>  $p < 0,05$  vs. DF.



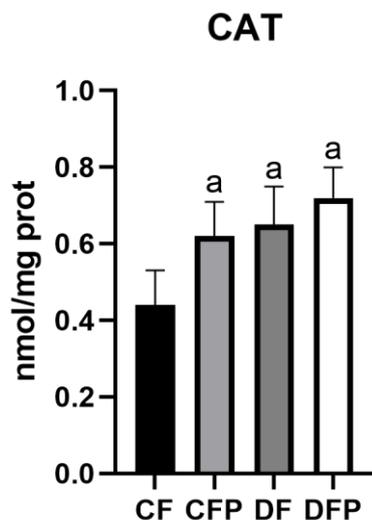
**Figura 48.** TBARS dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>c</sup>  $p < 0,05$  vs. DF.

Em relação aos antioxidantes, à atividade da CAT foi maior no grupo DF em relação ao grupo CF. Houve aumento nos grupos tratados com piridostigmina em relação ao grupo CF, indicando um efeito positivo do tratamento na detoxificação do peróxido de hidrogênio (Figura 49 e 50).

### PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

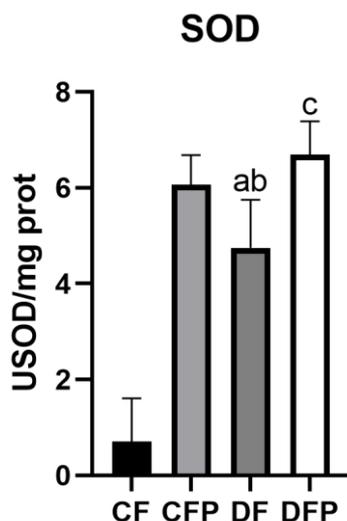


**Figura 49.** Concentração de peróxido de Hidrogênio dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. C, <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CF.



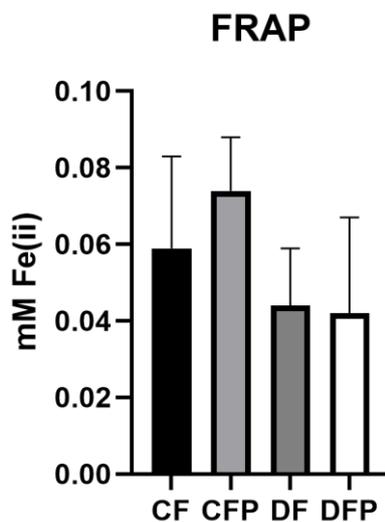
**Figura 50.** Atividade da enzima antioxidante Catalase no ventrículo esquerdo dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. C.

A atividade da SOD apresentou-se reduzida no grupo DF em comparação aos demais grupos. No grupo DFP a administração de piridostigmina restabeleceu a SOD, sugerindo recuperação da atividade antioxidante por meio da modulação colinérgica (Figura 51).



**Figura 51.** Expressão da enzima antioxidante superóxido dismutase no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs. C, <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs. CF e <sup>c</sup>  $p < 0,05$  vs. D.

A FRAP, representativa da capacidade antioxidante não enzimática, apresentou-se reduzida nos grupos DF e DFP, porém sem diferenças estatísticas (Figura 52).



**Figura 52.** Atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos: controle frutose (CF, n=10), controle frutose + piridostigmina (CFP, n=10), diabético frutose (DF, n=10), diabético frutose + piridostigmina (DFP, n=10) ao final do protocolo. Dados representam médias  $\pm$  DPM.

### 6.2.9 Estudo de correlação

O estudo de correlações (Tabela 29) entre as variáveis envolvendo os grupos DF e DFP (n=6-10 animais por grupo) demonstrou que:

-a Var IP apresentou correlações negativas com o dano à proteína (carbonilas) no tecido cardíaco ( $r=-0,71$ ;  $p=0,0148$ ) e com a deposição de colágeno do VE (% colágeno VE/mm<sup>2</sup>) ( $r=-0,68$ ;  $p=0,0145$ );

-a oxidação de proteínas foi positivamente correlacionada a concentração de peróxido de hidrogênio ( $r=0,64$ ;  $p=0,0259$ ) e com a lipoperoxidação ( $r=0,71$ ;  $p=0,0069$ ) no coração;

-a oxidação de proteínas apresentou correlações positivas com a deposição de colágeno (% colágeno VE/mm<sup>2</sup>) ( $r=0,59$ ;  $p=0,0429$ ) e com a massa do VE ( $r=0,60$ ,  $p=0,0252$ );

-a deposição de colágeno (% colágeno VE/mm<sup>2</sup>) foi positivamente correlacionada com a massa do VE ( $r=0,58$ ,  $p=0,0075$ ).

**Tabela 29** – Correlações de Person envolvendo animais dos grupos diabético frutose (DF) e diabético frutose + piridostigmina (DFP).

	<b>Carbonilas (nmol/mg proteína)</b>
<b>Var IP (ms<sup>2</sup>)</b>	$r=-0,71$ ; $p=0,0148^*$
<b>Peróxido de Hidrogênio (μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>	$r=0,64$ ; $p=0,0259^*$
<b>TBARS (μmol/mg proteína)</b>	$r=0,71$ ; $p=0,0069^*$
<b>% colágeno VE/mm<sup>2</sup></b>	$r=0,59$ ; $p=0,0429^*$
<b>Massa Ventrículo Esquerdo (VE) (mg)</b>	$r=0,60$ , $p=0,0252^*$
	<b>% colágeno VE/mm<sup>2</sup></b>
<b>Var IP (ms<sup>2</sup>)</b>	$r=-0,68$ ; $p=0,0145^*$
<b>Carbonilas (nmol/mg proteína)</b>	$r=0,59$ ; $p=0,0429^*$
<b>Massa VE (mg)</b>	$r=0,58$ , $p=0,0075^*$

Dados foram analisados usando correlação de Person para Variância do intervalo de pulso, TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

***DISCUSSÃO***

---

## ***7 Discussão***

Ao longo dos anos, o grupo de pesquisa responsável por este trabalho, tem se dedicado ao estudo das alterações cardiovasculares associadas ao diabetes experimental, com ênfase na análise temporal dessas modificações. O modelo experimental mais frequentemente utilizado por nós e outros pesquisadores é o induzido pela administração de estreptozotocina (STZ). Além disto, nas últimas 2 décadas temos estudado o modelo de disfunção cardiometabólica associado à sobrecarga de frutose, em função do elevado consumo desse açúcar em alimentos industrializados. Considerando a importância atual da evolução progressiva dos casos de diabetes tipo 2, a busca por um modelo de DM2 não genético que pudesse atender melhor ao caráter translacional da pesquisa neste modelo de doença metabólica passou a ser um dos objetivos do grupo. Nesta tese buscamos estabelecer um modelo de diabetes tipo 2 pela associação de estreptozotocina e consumo de frutose em ratos. O modelo de diabetes tipo 2 de associação da frutose com a STZ apresentou-se de forma mais insidiosa e crônica quando comparado ao modelo da STZ endovenosa, que resultou em uma instalação rápida da doença. Nossos dados demonstram que o modelo de associação de frutose com baixas doses de STZ parece estar mais próximo da situação observada em pacientes com diabetes tipo 2, onde a disfunção autonômica cardiovascular está presente. Vale destacar que o desbalanço autonômico parece ser o mecanismo chave para o entendimento dos processos metabólicos e cardiovasculares associados com as doenças cardiometabólicas (Angelis et al., 2012; Bernardes et al., 2018; Satapathy et al., 2011). Neste sentido, propusemos estimular a via anti-inflamatória colinérgica com o uso da PIR neste modelo de DM2 e testar a hipótese que este tratamento seria capaz de atenuar os efeitos cardiometabólicos, autonômicos e de estresse oxidativo nesta condição.

## 7.1 Capítulo 1

A estreptozotocina (STZ) destrói seletivamente as células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas, induzindo um quadro clínico semelhante ao diabetes mellitus em seres humanos. Essa condição caracteriza-se por hiperglicemia, hipoinsulinemia, glicosúria, poliúria, polidipsia e perda de peso corporal (Maeda et al., 1995; Tomlinson KC et al., 1981). Entretanto, os animais submetidos à indução diabética com STZ sobrevivem sem a necessidade de administração exógena de insulina. Por esse motivo, este modelo tem sido amplamente utilizado para o estudo do diabetes tipo 1 e tipo 2 em roedores conforme discutido no artigo de Samuel RO que aborda a comparação entre diferentes protocolos de indução de diabetes com STZ em roedores (Samuel et al., 2014).

O consumo de frutose tem sido amplamente utilizado nas últimas 2 décadas em função da frutose. Estudos clínicos revelaram que seu excesso favorece o ganho de peso e de gordura visceral, a dislipidemia, o aumento da pressão arterial, a intolerância à glicose e a resistência à insulina. Estas evidências sugerem a frutose como sendo determinante para o desenvolvimento da SM e um fato de risco importante para o desenvolvimento de obesidade, diabetes do tipo 2 e DCVs (Coronati et al., 2022; DiNicolantonio et al., 2018; Taskinen et al., 2017).

Os resultados obtidos sobre o peso corporal revelaram diferenças entre os grupos controle e diabéticos ao longo do protocolo experimental. No início do estudo, todos os animais apresentavam pesos corporais semelhantes. No entanto, ao final do estudo observou-se o aumento do peso corporal nos grupos controle e controle frutose (C e CF), o que era esperado para as condições de alimentação e ingestão de frutose nestes grupos.

O consumo de frutose no grupo CF não promoveu ganho de peso adicional significativo, quando comparado ao grupo C, sugerindo que, a frutose não foi capaz de promover o ganho de peso acentuado nos animais normoglicêmicos. Esse achado corrobora com alguns estudos prévios que mostram que o impacto da frutose sobre o ganho de peso pode depender da dose, duração do consumo e da presença de distúrbios metabólicos prévios (Nascimento et al., 2008; Tunc-Ata et al., 2021).

Nos animais diabéticos (D e DF), foi possível observar que no início do protocolo o peso corporal era semelhante entre todos os grupos, mas que após a indução do diabetes os animais tiveram peso menor quando comparados aos controles com e sem frutos no tempo final. A redução no ganho de peso é compatível com os efeitos catabólicos da resistência à insulina ou da sua deficiência, comuns em modelos de DM experimental

induzidos por STZ. A administração de STZ em ratos induz um quadro de DM, caracterizado por hiperglicemia, poliúria, polidipsia e perda de peso, mesmo com aumento da ingestão alimentar. A hiperglicemia persistente, resultante da destruição parcial das células  $\beta$  pancreáticas, leva a um estado de insulinopenia, comprometendo o metabolismo anabólico e promovendo a degradação de proteínas e lipídeos para suprir as necessidades energéticas do organismo. A perda de peso observada pode estar associada a maior degradação proteica e lipídica, além da hiperglicemia, fatores estes que comprometem o anabolismo corporal (Dupas et al., 2017).

Como esperado o grupo DF, apresentou um valor final de peso corporal superior ao grupo D, embora inferior aos grupos controles. Esse valor maior de peso provavelmente se associa ao modelo de diabetes utilizado, com uma dose menor de estreptozotocina e mais as semanas de tratamento com frutose.

Os dados indicam que o DM foi o principal fator para a perda de peso corporal, e que o consumo de frutose embora não tenha sido capaz de interferir significativamente no ganho de peso nos animais dos grupos controles, foi capaz de garantir ganho de peso no grupo tratado com estreptozotocina e frutose.

Quando observado os valores referentes ao Índice de Massa Corporal (IMC), representado pelo índice de Lee, pode-se ver uma redução deste índice no grupo D em comparação aos demais grupos, indicando a perda de massa corporal no grupo D. Entretanto, o grupo DF não apresentou uma queda tão acentuada, sugerindo que o consumo contínuo de frutose associado ao uso da STZ, não permitiu a perda acentuada da massa corporal observada no grupo D. O índice de Lee é uma medida antropométrica utilizada em estudo com roedores, especialmente em ratos, para estimar a adiposidade corporal e avaliar a obesidade de forma não invasiva. O índice foi desenvolvido como uma alternativa ao IMC humano, adaptado para as características morfológicas dos roedores (Nascimento et al., 2008; Tunc-Ata et al., 2021).

A análise dos dados sobre a glicemia e os triglicerídeos revela que ambos apresentam impactos distintos da indução do DM somente por STZ ou associado ao consumo contínuo de frutose nos parâmetros metabólicos dos grupos estudados.

Inicialmente, os níveis glicêmicos eram semelhantes entre os grupos, contudo, ao final do protocolo experimental, foi possível observar o aumento significativo dos níveis glicêmicos dos grupos D e DF, confirmando o sucesso da indução do DM por STZ. Vários estudos demonstram que a administração de STZ em ratos resulta em hiperglicemia

devido à destruição das células  $\beta$  pancreáticas e conseqüentemente deficiência de insulina (Tappy; Lê, 2010).

O grupo DF apresentou níveis glicêmicos numericamente maiores que o grupo D, até mesmo pela diferença da glicemia observada no período inicial e final do protocolo, sugerindo que o consumo de frutose pode exacerbar a hiperglicemia nestes animais, pois a frutose é metabolizada principalmente no fígado, onde pode ser convertida em glicose e contribuir para o aumento da glicemia plasmática, principalmente em condições de resistência à insulina (Tappy; Lê, 2010).

O mesmo comportamento observado nos níveis glicêmicos foi observado para os triglicerídeos. No início do protocolo, todos os grupos apresentaram valores semelhantes e ao final do protocolo, houve o aumento significativo nos grupos que receberam frutose (CF e DF), e no grupo D. Este comportamento dos triglicerídeos pode ser atribuído ao metabolismo hepático da frutose, que favorece a lipogênese e a síntese de triglicerídeos (Tappy; Lê, 2010). No grupo D, a elevação dos triglicerídeos, provavelmente, está relacionada à deficiência da insulina, comprometendo a atividade da lipoproteína lipase e na redução da depuração de lipoproteínas ricas em triglicerídeos, como os quilomícrons e as VLDL (Crescenzo et al., 2014; Dall'Ago et al., 2002; Mock et al., 2017).

Os dados do presente estudo indicam que a indução do DM por STZ, em associação ao consumo de frutose afetam significativamente os níveis glicêmicos e de triglicerídeos em ratos. A frutose, embora não tenha promovido ganho de peso adicional em animais não diabéticos, promoveu a hiperglicemia e o aumento dos triglicerídeos nos animais diabéticos.

A KITT é um parâmetro derivado do ITT utilizado para avaliar a sensibilidade à insulina em modelos experimentais, como ratos. Durante o ITT, uma dose de insulina é administrada, e a glicemia é monitorada ao longo do tempo. O KITT representa a taxa de diminuição da glicose plasmática, expressa como uma porcentagem por minuto (%/min), calculada através da curva glicêmica em função do tempo. Valores elevados de KITT indicam maior sensibilidade à insulina, enquanto valores reduzidos sugerem resistência à insulina (BONORA et al., 1989).

Através da constante de decaimento da glicose (KITT), observou-se diferenças entre os grupos estudados. A redução do KITT no grupo CF indica que o consumo contínuo de frutose foi capaz de causar resistência à insulina mesmo em animais não diabéticos. Esse achado é consistente com estudos anteriores que demonstram que dietas ricas em frutose podem levar à resistência à insulina, mesmo na ausência de

hiperglicemia. Nos grupos D e DF, a diminuição do KITT confirma a resistência à insulina decorrente da destruição das células  $\beta$  pancreáticas induzidas pela STZ. Os grupos D e DF apresentaram valores semelhantes de KITT, sugerindo que o consumo de frutose não apresentou efeito adicional sobre a resistência à insulina nestes animais (Ayala et al., 2006; Lee et al., 2008).

De modo geral, os animais tratados com STZ apresentam redução ou manutenção dos níveis de pressão arterial e frequência cardíaca (FC) em comparação aos animais controle, com tais alterações sendo detectadas a partir de cinco dias após a administração da droga (Maeda et al., 1995), o que tem sido atribuído a modificações na atividade do nodo sinusal (Dall'Ago et al., 2007; Senges, 1980). Nosso grupo também associou o consumo crônico de frutose, em ratos Wistar machos e fêmeas, ao aparecimento de resistência à insulina, elevação de triglicérides, intolerância à glicose e disfunção cardiovascular e autonômica e inflamação (Bernardes et al., 2018; Brito et al., 2008; Farah et al., 2006).

Sobre os dados hemodinâmicos foi possível observar que os grupos diabéticos (D e DF) apresentaram reduções significativas na PAS, PAD, PAM e na FC em comparação ao grupo C. Tais alterações sugerem a presença de hipotensão e bradicardia associada à indução do DM por STZ. A bradicardia observada, pode estar relacionada à diminuição do tônus simpático e parassimpático cardíaco, conforme evidenciado por respostas cronotrópicas atenuadas a bloqueadores autonômicos em modelo experimental de DM (Schaan et al., 2004). No entanto, existe a possibilidade de uma ação direta da STZ sobre o marcapasso cardíaco provocando disfunção do nó sinusal (Kondo et al., 2019).

A diminuição da complacência arterial pode ocorrer devido a redução da PP em ratos diabéticos, como observado nos resultados, possivelmente decorrente de alterações estruturais na parede vascular induzidas pela hiperglicemia crônica, que pode levar ao acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e aumento do estresse oxidativo, comprometendo a elasticidade arterial (Anand Swarup et al., 2010).

O consumo contínuo de frutose pode levar a alterações hemodinâmicas. Nesse trabalho, no entanto, não se observaram mudanças hemodinâmicas nos animais somente tratados com frutose (CF) quando comparados ao grupo controle intacto (C). Já a comparação entre os grupos diabéticos tratados ou não com frutose não mostrou alterações significativas, embora os grupos diabéticos sejam significativamente diferentes dos grupos C e CF.

Vale lembrar que muitos estudos têm estabelecido a disautonomia autonômica cardiovascular como um preditor preciso de morbidade e mortalidade em humanos e roedores. Neste contexto, o método de variabilidade da frequência cardíaca, é uma ferramenta importante para avaliar o desbalanço autonômico, nas alterações metabólicas que favorecem as DCVs. Neste sentido, as evidências clínicas e experimentais têm mostrando que o consumo de frutose é um importante fator para o aumento da pressão arterial seguido do desenvolvimento da hipertensão (Goldberger et al., 2019; Puente-Ruiz; Jais, 2022). Entre os mecanismos envolvidos a disfunção autonômica parece ter um papel significativo sobre o sistema cardiovascular, em consequência do consumo de frutose (Bernardes et al., 2018).

A disfunção autonômica cardiovascular é frequentemente associada ao DM e pode ter sido a fonte causadora da hipotensão nos animais dos grupos D e DF. Estudos demonstram que a indução do DM em ratos resulta em alterações no controle autonômico da PA, com redução da variabilidade e comprometimento do reflexo barorreceptor. Neste sentido, em um curto intervalo de tempo após a indução do diabetes por STZ, os animais já apresentavam prejuízo no controle reflexo da pressão arterial (PA), particularmente evidenciado pela atenuação da resposta taquicárdica frente a quedas da PA (Maeda et al., 1995). Nos animais submetidos ao DM por STZ e/ou ao consumo crônico de frutose, foi possível observar o comprometimento da função autonômica cardiovascular. Essas alterações, foram evidenciadas por meio da avaliação da sensibilidade barorreflexa, variabilidade de frequência cardíaca e pela variabilidade da pressão arterial. Conforme observado nesta tese, os grupos D e CF tratamentos resultaram em uma redução da resposta bradicárdica, corroborando com achados prévios. Portanto, não apenas os animais submetidos ao tratamento com STZ, mas também os submetidos ao consumo de frutose apresentaram redução dessa resposta, incluindo o grupo que recebeu a associação de frutose e STZ (DF) (Bernardes et al., 2018). Dados da literatura corroboram com esses resultados, demonstrando que o DM induzido por STZ leva a disfunção barorreflexa, possivelmente devido a neuropatia autonômica diabética (Ai et al., 2010; Dall'Ago et al., 2002), mas que essa disfunção barorreflexa pode ser diferente na medida de outros fatores como gravidade e tempo de doença. Esse achado parece também se aplicar à resposta taquicárdica, visto que os grupos submetidos à sobrecarga de frutose apresentaram redução da resposta reflexa às quedas de pressão arterial (PA). De fato, como observado por Gogan A et al., a disautonomia associada ao diabetes é amplamente conhecida, tanto em modelos experimentais quanto na condição clínica (Gogan et al., 2025).

Conforme observado no presente estudo, além da redução da sensibilidade do baroreflexo, foi constatada uma redução da modulação simpática e parassimpática sobre a frequência cardíaca (FC). Nossos resultados demonstram que tanto o consumo crônico de frutose quanto a indução do DM por STZ, são capazes de promover alterações autonômicas cardiovasculares, evidenciadas por redução da VFC e VPA. Tais alterações podem contribuir para o aumento do risco de eventos cardiovasculares em indivíduos com DM e/ou pelo consumo elevado de frutose. Tal redução foi evidenciada pela diminuição dos componentes LF e HF absolutos da variabilidade da FC, bem como pela redução do desvio padrão da FC no grupo associação (DF). A modulação reduzida observada provavelmente se associou a uma variabilidade da pressão arterial menor (DP PAS) nos três grupos submetidos ao tratamento, com uma redução significativa também nos grupos diabéticos. O presente trabalho corrobora com dados publicados que mostram que o DM reduz a VFC, refletindo disfunção autonômica do músculo cardíaco (Dall'Ago et al., 2002).

Além disto, de acordo com a análise simbólica, a variável 0V indica baixa variação e apresentou menor valor no grupo DF, o que está de acordo com os resultados do balanço simpato-vagal nesse grupo. Esse resultado pode indicar uma contribuição relativa menor do componente simpático, o que é característico de disfunções autonômicas mais graves. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, os pacientes diabéticos apresentaram, de fato, redução da modulação autonômica total.

É importante destacar que o estresse oxidativo desempenha um papel crucial na fisiopatologia das complicações cardiovasculares associadas ao DM e ao consumo excessivo de frutose (Giacco; Brownlee, 2010). Neste sentido, aumento de dano oxidativo, devido a presença de EROs e da diminuição da defesa antioxidante foi previamente observada em tecido cardíaco de modelos experimentais de sobrecarga de frutose por períodos longos em fêmeas ooforectomizadas e na prole de filhos de pais submetidos ao consumo de frutose (Bernardes et al., 2018; Conti et al., 2014). No presente trabalho, observou-se que a combinação dessas duas condições metabólicas (STZ+frutose) aumentou o desequilíbrio redox no tecido cardíaco, caracterizado por aumento de pró-oxidantes, redução de antioxidantes e consequente aumento de dano oxidativo no grupo associação (STZ+frutose).

Além disto, outra alteração observada associada à dieta rica em frutose tanto em estudo clínicos como experimentais é o aumento de ácido úrico, e este por sua vez, têm

sido associado a lipogênese, resistência à insulina e mecanismos da SM, com consequente promoção de inflamação e desbalanço no perfil de estresse oxidativo. O aumento de ácido úrico extracelular pode ser considerado benéfico por possuir poder antioxidante, no entanto, o excesso de ácido úrico intracelular pode levar a um perfil de estresse oxidativo e disfunção celular (Johnson et al., 2013). Nesse sentido, a formação de ácido úrico tem sido relacionada a estimulação do sistema NADPH-oxidase (NOX), que por sua vez, é um dos importantes sistemas geradores de EROs no sistema cardiovascular.

O consumo de frutose em animais adultos promove alterações entre as EROs, com aumento do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e a redução de enzimas antioxidantes, favorecendo o desenvolvimento do estresse oxidativo (Conti et al., 2014; Farah et al., 2006). Além disso, os fatores associados a qualidade de vida, permitem que a EROs, contribua para o controle epigenético na expressão dos genes, resultando no desenvolvimento das disfunções metabólicas e de DCVs, ao longo da vida (Rodríguez-Rodríguez et al., 2018).

Neste caso, os metabólitos originados pelo metabolismo hepático da frutose, como o ácido úrico e o triacilglicerídeos, desencadeia a formação não só da inflamação, como também de EROs (Castro et al., 2015).

Apesar de não termos diferença na lipoperoxidação entre os grupos estudados, observou-se níveis elevados de carbonilas no grupo DF indicando um aumento do dano oxidativo a proteínas, sugerindo que a associação entre DM e frutose intensifica a oxidação proteica no miocárdio. Esse achado está alinhado com estudos que demonstram a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) em condições hiperglicêmicas, os quais promovem disfunção cardíaca por meio de modificação de proteínas estruturais e funcionais (Asmat; Abad; Ismail, 2016; Rolo; Palmeira, 2006).

Além disso, o aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio no grupo DF sugere um acúmulo destas EROs no tecido cardíaco, corroborando a hipótese de que a sobrecarga de frutose em um indivíduo diabético potencializa o estresse oxidativo. Além disto, a atividade da NADPH oxidase estava aumentada no grupo associação DF, sugerindo maior produção de ânion superóxido, um potente pró-oxidante. Essa condição favorece o dano oxidativo, contribuindo, ainda mais, para a disfunção (Giacco; Brownlee, 2010; Petheó; Szeles; Geiszt, 2024).

De fato, associado ao aumento de pró-oxidantes, a SOD, responsável por catalisar a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, mostrou-se reduzida nos grupos CF em relação ao grupo C. A atividade da SOD foi ainda mais reduzida no grupo

DF. Além disto, na análise da atividade das enzimas antioxidantes observou-se que a CAT, responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio, apresentou redução no grupo CF em comparação ao grupo C, indicando que a frutose isoladamente compromete a capacidade antioxidante do tecido cardíaco (Asmat; Abad; Ismail, 2016; Johnson et al., 2013). Vale destacar que a atividade da CAT não foi diferente entre os grupos CF e DF e estava aproximadamente 30% reduzida em relação ao grupo C. Adicionalmente, a capacidade antioxidante total não enzimática, avaliada pela FRAP, estava diminuída nos grupos CF, D e DF em comparação ao grupo C, sendo a redução mais acentuada no grupo DF. Esses resultados reforçam que a associação do DM e frutose compromete severamente o sistema de defesa antioxidante do miocárdio (Asmat; Abad; Ismail, 2016; Matough et al., 2012), o que pode estar associado ao aumento de pró-oxidantes e do dano oxidativo observado no grupo DF.

Associado a disfunção metabólica, autonômica e ao desbalanço redox discutidos anteriormente, a análise histológica dos ventrículos apresentou alterações na morfometria e na deposição de colágeno associadas ao consumo de frutose e ao DM por STZ. Houve aumento da área total do VE nos grupos CF e D em comparação ao grupo controle, sugerindo remodelamento ventricular. Esse aumento pode estar relacionado à hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga metabólica e hemodinâmica. Estudos demonstram que dietas ricas em frutose promovem hipertrofia ventricular e disfunção contrátil, associadas à inflamação e estresse oxidativo.

Além disto, de forma importante a deposição de colágeno no VD e VE foi significativamente maior nos grupos CF e DF em comparação ao grupo C, indicando aumento da fibrose miocárdica. A fibrose cardíaca compromete a elasticidade piorando a função contrátil e de relaxamento do miocárdio, contribuindo para a disfunção cardíaca. A frutose pode induzir a formação de fibrose por meio de vias inflamatórias e estresse oxidativo, enquanto o DM promove fibrose através da ativação de fatores pró-fibróticos como TGF-B1 (Flues et al., 2010).

A combinação de frutose e STZ no grupo DF resultou em maior deposição de colágeno no VE e VD do que a observada nos demais grupos, sugerindo um efeito sinérgico na promoção da fibrose cardíaca. Esse efeito pode ser mediado pela amplificação do estresse oxidativo e da inflamação, causando o aumento do remodelamento cardíaco.

Desta forma, é provável que o maior desbalanço autonômico e redox, possam ter contribuído para a deposição de colágeno no VE, com impacto na morfometria e função

cardíacas no grupo associação (STZ+frutose). A análise dos dados ecocardiográficos mostrou alterações tanto na morfometria quanto na função cardíacas dos animais estudados, destacando os efeitos do consumo de frutose associada ao STZ e naqueles tratados apenas com no remodelamento e desempenho do VE. Neste sentido, estudos anteriores de nosso grupo evidenciaram tanto o modelo de estreptozotocina como o modelo de sobrecarga de frutose prejuízo na morfometria e função cardíaca (Morvan et al., 2013; Wichi et al., 2007).

Na morfometria cardíaca observou-se que os animais que consumiram frutose (CF e DF) apresentaram aumento nos diâmetros diastólico e sistólico do VE quando comparado ao grupo C, sugerindo a presença de remodelamento ventricular. Além disso, observou-se maior espessura diastólica da parede anterior nesses grupos, sugerindo hipertrofia ventricular. Estas alterações morfológicas podem ser atribuídas ao efeito da frutose na sobrecarga volumétrica e na hipertrofia do miocárdio.

Artigos publicados mostram que dietas ricas em frutose são capazes de provocar alterações estruturais no músculo cardíaco (hipertrofia ventricular) levando ao remodelamento, mesmo na ausência de hipertensão arterial. Tais alterações ocorrem devido a ativação de vias metabólicas que promovem o acúmulo de lipídeos e pelo aumento do estresse oxidativo no tecido (Park et al., 2018; Zhang et al., 2016).

A avaliação da função sistólica representada pela fração de ejeção e fração de encurtamento apresentou-se reduzida em todos os grupos (CF, D e DF) em comparação ao grupo controle, indicando o comprometimento da função contrátil do VE em todos os grupos tratados. No entanto, está ainda se apresenta preservada, tendo em base artigos já publicados pelo nosso grupo. Isso indica que não apenas o consumo de frutose isolado, mas também a associação com STZ são responsáveis pelo prejuízo da função sistólica nestes animais. A literatura confirma estes resultados, pois dados apresentados por vários grupos mostram que a hiperglicemia crônica e a resistência à insulina podem levar à disfunção miocárdica por meio de mecanismos como acúmulo de produtos finais de glicação avançada, estresse oxidativo e alterações na sinalização intracelular de cálcio (SALEMI et al., 2005).

Sobre a função diastólica observa-se que os grupos diabéticos (D e DF), tiveram uma redução da razão  $E'/A'$  quando comparados ao grupo CF, quando comparados ao grupo C. Além disso, nos animais com diabetes e com associação ao consumo de frutose (DF) os valores do TRIV apresentaram-se aumentados, quando comparados aos grupos controles (C e CF), sugerindo atraso no relaxamento ventricular. A relação  $E/TRIV$ , que

também está associada a pressão de enchimento ventricular esquerdo, apresentou-se reduzida no grupo DF em relação aos demais. Acreditamos que esta redução deva estar associada ao aumento do TRIV neste grupo, que por sua vez, deve estar relacionada a redução da frequência cardíaca traduzindo-se no aumento de tempo de todas as fases do ciclo cardíaco.

Os resultados ecocardiográficos do presente trabalho evidenciam que tanto o consumo crônico de frutose, quanto o DM induzido por STZ causaram alterações na morfometria e na função cardíaca, incluindo: remodelamento ventricular, hipertrofia, disfunção sistólica e diastólica. Demonstrando a importância de considerar os efeitos metabólicos da frutose e da hiperglicemia no desenvolvimento de cardiomiopatias, reforçando a necessidade de estratégias preventivas e terapêuticas para minimizar os impactos cardiovasculares associados às condições descritas.

Em conjunto, os resultados das análises do capítulo 1 indicam que a combinação de DM e consumo excessivo de frutose está associado à disfunção autonômica cardiovascular e estresse oxidativo cardíaco, o que pode estar relacionado a maior comprometimento da função cardíaca, principalmente diastólica. Neste sentido, estratégias terapêuticas que visem reduzir a ingestão de frutose e melhorar o controle glicêmico podem ser eficazes na mitigação do dano oxidativo, na fibrose cardíaca e consequente melhora da sua função e ainda na prevenção de complicação cardiovasculares em pacientes diabéticos (Giacco; Brownlee, 2010; Johnson et al., 2013).

## 7.2 Capítulo 2

A piridostigmina é um inibidor reversível da enzima acetilcolinesterase e amplamente utilizada no tratamento de distúrbios neuromusculares, como a miastenia gravis. Sua principal ação nas células musculares esqueléticas ocorre na junção neuromuscular, onde impede a degradação da acetilcolina, aumentando a sua disponibilidade e prolongando sua ação nos receptores nicotínicos pós-sinápticos. Esse mecanismo resulta em uma melhora na transmissão neuromuscular e, conseqüentemente, na força muscular (Richtsfeld et al., 2013).

Vale lembrar que o desbalanço autonômico ocasionado pelo consumo de frutose parece estar associado à modulação da via RCAT, responsável por regular a inflamação e conseqüentemente estresse oxidativo (Bernardes et al., 2018; Pavlov; Tracey, 2005). Além disto, há indícios de que essa via pode colaborar para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas. Nesse sentido, estudos clínicos e experimentais têm relatado que o uso de fármacos que modulam a via RCAT, como a PIR ou a galantamina, mostram efeitos positivos sobre as alterações metabólicas e autonômicas cardiovasculares (Consolim-Colombo et al., 2017)

Na avaliação do peso corporal ao longo do protocolo foi possível observar que todos os grupos iniciaram o protocolo com peso semelhante. Porém, ao final do protocolo, observou-se o aumento de peso nos grupos CF e CFP, o que é esperado diante a ingesta exclusiva de frutose, causando um acúmulo energético, e a inatividade física, causando uma redução do gasto calórico. Por outro lado, os grupos diabéticos (DF e DFP) apresentaram redução de peso quando comparado ao grupo CF. Esse achado é coerente com a literatura que descreve a perda de peso como um dos sinais característicos do DM induzido por STZ, atribuído principalmente à deficiência de insulina, hiperglicemia não compensada e aumento do catabolismo de proteínas e lipídeos (Aragno et al., 2008; Taye; Abouzied; Mohafez, 2013)

Estudos indicam que a piridostigmina não causa alterações significativas em relação a perda de peso em humanos. No entanto, em modelos animais alimentados com dieta rica em gordura, a piridostigmina foi capaz de reduzir o peso corporal. Esse efeito foi atribuído ao nervo vago, por ser capaz de promover a termogênese do tecido adiposo, aumentando o gasto energético. Embora estudos indiquem que a piridostigmina pode melhorar parâmetros autonômicos e metabólicos, seus efeitos sobre a composição

corporal ainda são discutidos e dependem da condição metabólica de base (Feriani et al., 2018).

Os dados indicam que o consumo de frutose está associado ao ganho de peso em animais normoglicêmicos, enquanto o DM induzido por STZ leva a perda de peso corporal, mesmo na presença de frutose na dieta. A piridostigmina não foi capaz de impedir o efeito catabólico nos animais diabéticos, sugerindo que sua ação não reverte as alterações metabólicas induzidas pela deficiência de insulina (Feriani et al., 2018). No presente estudo, no grupo DFP a piridostigmina não foi suficiente para prevenir a perda de peso associada ao DM e também observada no grupo DF.

O índice de Lee tem sido amplamente utilizado em estudos que investigam alterações na composição corporal decorrente de intervenções dietéticas ou farmacológicas. Em modelos de DM por STZ, é comum observar uma redução no peso corporal e na adiposidade devido à deficiência de insulina, que leva a um estado catabólico por degradação proteica e lipídica. A administração de frutose, por sua vez tem sido associada ao aumento da adiposidade e resistência à insulina em roedores. A administração da piridostigmina em animais normoglicêmicos pode estar associada a um discreto aumento de adiposidade, demonstrando que a modulação colinérgica exercida por inibidores da acetilcolinesterase pode impactar na homeostase energética e no armazenamento de gordura em animais saudáveis (Xia et al., 2017).

O índice de Lee apresentou-se diminuído somente no grupo DF, confirmando o efeito do DM na redução do tecido adiposo mesmo na presença de uma dieta rica em frutose (Aragno et al., 2004; Malafaia et al., 2013).

Os níveis glicêmicos de todos os grupos foram semelhantes no início do protocolo. Contudo, ao final do estudo, os grupos diabéticos (DF e DFP) apresentaram níveis elevados na glicemia em comparação aos seus valores iniciais e aos grupos controles (CF e CFP). Esses resultados confirmam a eficácia da indução do DM por STZ (Aragno et al., 2004). A administração da piridostigmina no grupo DFP não atenuou a hiperglicemia induzida pelo DM por STZ. Embora estudos anteriores tenham demonstrado que a piridostigmina pode aumentar a resposta insulínica ao estímulo glicêmico em indivíduos obesos, esse efeito não foi observado em indivíduos normoglicêmicos, sugerindo que sua eficácia depende do estado metabólico basal e a gravidade da hiperglicemia/hipoinsulinemia (Tappy; Lê, 2010).

A hiperglicemia crônica associada ao DM pode levar a alterações no metabolismo lipídico, resultando em hipertrigliceridemia. Esse fenômeno é frequentemente atribuído à

resistência à insulina e ao aumento da lipólise, que elevam a concentração de ácidos graxos livres no plasma sanguíneo, promovendo a síntese hepática de triglicerídeos (Lu et al., 2018).

A administração da piridostigmina resultou na atenuação da elevação dos níveis de triglicerídeos, no grupo DFP em comparação ao grupo CF no mesmo momento (final). Apenas o grupo DF foi diferente do grupo CF neste momento. Embora a piridostigmina seja bem conhecida por sua função na transmissão neuromuscular, seus efeitos sobre o metabolismo lipídico não são completamente compreendidos. Algumas evidências sugerem que a modulação colinérgica pode influenciar no metabolismo energético e lipídico, mas os mecanismos exatos permanecem pouco claros (Lu et al., 2018). Neste trabalho, a piridostigmina não foi capaz de atenuar a hipertrigliceridemia associada ao consumo de frutose ou à condição diabética.

A constante de decaimento da glicose (KITT) é um parâmetro derivado do Teste de Tolerância a Insulina (ITT), utilizado para avaliar a sensibilidade à insulina em modelos experimentais. Seu resultado mostra a taxa de decaimento da glicose plasmática em porcentagem por minuto (%/min) após a administração de insulina, refletindo a eficiência com que a insulina promove a captação da glicose pelos tecidos periféricos (Lee et al., 2008).

Os dados do presente trabalho indicam a redução na sensibilidade à insulina nos grupos diabéticos, evidenciada pelos baixos valores de KITT. Valores de KITT inferiores a 25%/min são geralmente indicativos de resistência à insulina (Lee et al., 2008). Em modelos animais, a piridostigmina demonstrou potencial para melhorar a sensibilidade à insulina, possivelmente através da modulação da atividade vagal e redução do estresse oxidativo (Brito et al., 2008), mas neste trabalho não se observou-se diferença entre os grupos diabéticos tratados ou não com piridostigmina.

Vale destacar que ainda com relação a resistência à insulina, o sistema autonômico parece desempenhar um papel importante. Tanto o nervo vago, quanto o simpático se conectam com o pâncreas, mas possuem funções antagônicas com relação a atividade da insulina. O parassimpático é conhecido por secretar e sintetizar a insulina (Thorp; Schlaich, 2015). Enquanto o simpático atenua a secreção e a síntese da insulina. Há indícios que a resistência à insulina em pacientes com diabetes do tipo 2 e hipertensão, estão associados a maior atividade simpática, seguido da redução na síntese e secreção de insulina (Jia; Sowers, 2021). Cabe ainda reforçar, que a resistência à insulina favorece a diminuição da sinalização vagal, e esta situação colabora para o desenvolvimento da DM

2 e de DCVs (Espinoza; Fuenzalida; Leiva, 2021). Neste sentido, Santos e colaboradores (2024), observaram na prole (51 dias de vida) de ratos que consumiram frutose uma correlação entre o desbalanço autonômico (predomínio da atividade simpática e redução do parassimpático) e a resistência à insulina.

A análise dos dados da pressão arterial e frequência cardíaca de repouso revelou que os grupos diabéticos DF e DFP apresentaram reduções na PAS, PAD, PAM e FC em comparação aos grupos controles (CF e CFP). Essas alterações são compatíveis com disfunção autonômica frequentemente observada em modelos de DM, mas também com as alterações da frequência cardíaca provavelmente por lesão a nível do marca passo cardíaco. Com a redução da FC, o débito cardíaco também reduz e a PA arterial gerada pode ser menor (De Angelis et al., 1997). Em outras palavras, as alterações da PA e da FC parecem associadas mais às características do modelo de diabetes do que por efeito da piridostigmina.

Vale citar trabalhos mais recentes como o estudo do efeito da nicotinamida na atenuação das complicações do diabetes induzido por STZ em ratos, que mostra que a nicotinamida reduziu a disfunção autonômica e aumentou a taxa de sobrevivência, protegendo o sistema nervoso autônomo durante a progressão do diabetes (Cruz et al., 2021).

Adicionalmente, estudamos o efeito do resveratrol como agente antifibrótico em tecidos afetados pelo diabetes, no mesmo modelo (Strunz et al., 2025).

Nossos resultados demonstraram que a administração de piridostigmina no grupo DFP atenuou a redução da PP observada no grupo DF. Embora existam evidências que mostrem que a piridostigmina pode melhorar a variabilidade da frequência cardíaca e a sensibilidade barorreflexa, contribuindo para uma melhor modulação autonômica cardiovascular (Soares et al., 2004), isso não ficou claro ao analisarmos os valores de PA e FC e apenas na PP se observou essa mudança no presente estudo

A análise da sensibilidade barorreflexa mostrou que o grupo CFP apresentou um aumento significativo na resposta bradicárdica em comparação ao grupo CF, indicando uma melhora na modulação autonômica nesses animais. De fato, a piridostigmina atua aumentando a disponibilidade de acetilcolina nas sinapses colinérgicas, potencializando sua atividade colinérgica e conseqüentemente, melhora a modulação autonômica cardiovascular. Estudos anteriores mostraram que a administração de piridostigmina em ratos normotensos aumentou a sensibilidade barorreflexa e a variabilidade da FC (Soares et al., 2004). A resposta bradicárdica nos grupos diabéticos (DF e DFP) entretanto, se

manteve reduzida e a piridostigmina não foi capaz de restaurar esse braço do arco reflexo. Por outro lado, ao observarmos a resposta reflexa de taquicardia, foi possível detectar que os grupos tratados com piridostigmina (CFP e DFP) mostraram um aumento dessa resposta ao serem comparados com seus controles, indicando uma melhor adaptação às quedas da PA, estímulo que desencadeia usualmente a resposta de taquicardia. No grupo diabético tratado com piridostigmina é provável que o aumento da resposta taquicárdica esteja associado com a bradicardia de repouso, pois sabe-se que a menor FC basal aumenta o "range" de excursão da FC para cima quando provocada por queda da PA. O mesmo não se observou no grupo só DF, apesar da bradicardia de repouso ser semelhante. Essa diferença pode ser atribuída ao efeito da piridostigmina nessa variável, nos animais tratados.

De fato, a piridostigmina tem sido associada à melhora da função autonômica em modelos de insuficiência cardíaca, sugerindo seu potencial terapêutico em condições de disfunção autonômica, reforçando a hipótese de que a piridostigmina pode desempenhar um papel benéfico na modulação da função cardiovascular em estados patológicos caracterizados por desequilíbrios autonômicos. Portanto, os dados sugerem que a piridostigmina pode melhorar a sensibilidade barorreflexa, especialmente em condições de comprometimento autonômico, como observado nos grupos diabéticos. No entanto sua eficácia pode ser limitada em estágios avançados de disfunção autonômica (Okamoto et al., 2025).

A análise da variabilidade da pressão arterial sistólica revelou alterações significativas entre os grupos diabéticos (DF e DFP) em comparação aos grupos controles (CF e CFP). Observou-se uma redução na variância da PAS (Var PAS) e no componente de baixa frequência (LF PAS) nos grupos diabéticos, indicando uma diminuição da modulação simpática da pressão arterial.

Estudos mostram que a piridostigmina pode melhorar a modulação autonômica cardiovascular, aumentando a variabilidade da frequência cardíaca e a sensibilidade barorreflexa. No entanto, no presente estudo, a administração de piridostigmina no grupo DFP não foi capaz de reverter completamente as alterações na variabilidade da PAS observadas no grupo DF. Sugerindo que, em estágios mais avançados de disfunção autonômica associada ao DM, a eficácia da piridostigmina pode ser limitada (De La Fuente et al., 2013; Soares et al., 2004).

A análise dos parâmetros de estresse oxidativo no tecido cardíaco demonstrou que a associação entre DM e consumo de frutose promoveu prejuízo adicional no balanço

redox cardíaco, refletido pelo aumento de pró oxidantes e pela redução de antioxidantes, com consequente aumento de dano oxidativo, conforme discutido no capítulo anterior. A administração de piridostigmina um inibidor da acetilcolinesterase, mostrou efeitos benéficos sobre vários desses marcadores, sugerindo modulação favorável do estresse oxidativo via estímulo colinérgico (Tain; Chan; Hsu, 2016).

Vale lembrar que as EROs são moléculas chaves ligadas a função e fisiopatologia das doenças cardiovasculares. O desbalanço oxidativo está associado a quadros inflamatórios, apoptose, disfunção endotelial e ao remodelamento e hipertrofia cardíaca (Agarwal et al., 2012; Belló-Klein et al., 2001). Ademais, o aumento da lipogênese causado pelo consumo de frutose é relacionado ao desbalanço no perfil redox (Alzamendi et al., 2010).

É importante destacar ainda que no desbalanço autonômico, o quadro de estresse oxidativo colabora para a simpatoexcitação. Chao et al. (2020) demonstraram aumento de EROs na região do RVLN nos descendentes das genitoras submetidas ao consumo de frutose, e atribuíram esta condição ao aumento da atividade simpática, nas observações das análises autonômicas (Chao et al., 2020). Neste sentido, os efeitos da modulação da PIR sobre o balanço simpato-vagal cardíaco podem ter colaborado para melhora dos parâmetros de estresse oxidativo.

Os níveis de carbonilas, indicador de oxidação de proteínas, que estavam aumentados no grupo DF em relação ao grupo C (capítulo 1), reforçando o dano oxidativo pela interação entre diabetes e frutose, foram atenuados pela administração de piridostigmina (grupo DFP vs. grupo DF e CF). Vale destacar que apesar de não termos observados aumentos de TBARS, que indicam peroxidação lipídica no grupo DF, houve redução deste parâmetro no grupo DFP (vs. DF), o que sugere efeito protetor da piridostigmina sobre a integridade das membranas celulares (Johnson et al., 2013). Estes resultados, evidenciam redução do dano oxidativo cardíaco associado ao tratamento com piridostigmina, evidenciando modulação no balanço redox (Asmat; Abad; Ismail, 2016; Matough et al., 2012).

De forma semelhante, os níveis de peróxido de hidrogênio, uma importante ERO, foram elevados no grupo DF em comparação aos grupos C e CF, mas tal aumento não foi observado no grupo DFP. Somado a isto a atividade da NADPH oxidase no miocárdio, fonte importante de ânion superóxido, foi expressivamente aumentada no grupo DF. A NADPH está entre as enzimas mais importantes na formação de EROs ( $O_2^-$  e  $H_2O_2$ ) nas células, durante a fagocitose, pelas células imunes, pela estimulação do ácido úrico e

outros mecanismos, como o sistema renina angiotensina. Em conjunto, estes achados relacionados a redução da concentração ou produção de pró-oxidantes confirmam a ação da piridostigmina na atenuação da exacerbação das EROs, presentes no modelo de associação de diabetes e sobrecarga de (Petheó; Szeles; Geiszt, 2024; Rolo; Palmeira, 2006).

Sobre a CAT, enzima responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio, observou-se aumento nos grupos tratados com piridostigmina (CFP e DFP) em relação ao grupo CF. Esse efeito demonstra a capacidade da piridostigmina de restaurar a atividade de defesa antioxidante enzimática, possivelmente por meio do aumento da sinalização colinérgica e redução da inflamação (Cheng et al., 2022). A maior atividade da CAT no grupo DF em relação ao CF talvez possa representar uma resposta compensatória na tentativa de detoxificar os elevados níveis de peróxido de hidrogênio observados neste grupo. Todavia, estudos futuros terão que confirmar esta hipótese. É interessante observar que a atividade da SOD apresentou redução no grupo DF, o que pode estar associado a tentativa de eliminar a ânion superóxidos advindos, por exemplo, da atividade aumentada da NADPH oxidase. No entanto, a atividade da SOD foi restabelecida no grupo DFP, aproximando-se dos valores observados no grupo CF. Tais achados indicam atenuação da disfunção desta enzima antioxidante induzida pela piridostigmina (Matough et al., 2012; Tracey, 2007). Por fim, vale comentar que a FRAP que estava expressivamente reduzida no grupo DF (capítulo 1), não apresentou melhora associada ao tratamento com piridostigmina, sugerindo que embora este tratamento tenha melhorado a atividade de enzimas antioxidantes específicas, o potencial antioxidante não enzimático total do tecido cardíaco permaneceu comprometido, o que sugere a necessidade de intervenções complementares para restaurar completamente o status redox global (Asmat; Abad; Ismail, 2016).

Nossos resultados evidenciam que o uso da PIR mostrou ser importante na modulação da resposta ao estresse oxidativo no miocárdio. No grupo DFP observamos redução da NADPH oxidase e da concentração de peróxido de hidrogênio associado a aumento das atividades da CAT e da SOD no tecido cardíaco, com consequente redução de danos oxidativo. Isto demonstra que a ativação vagal e da via RCAT pode ter contribuído para a redução da inflamação e do estresse oxidativo. Estudos anteriores mostraram efeitos semelhantes (redução do estresse oxidativo e melhora dos parâmetros antioxidantes em fígado e músculo esquelético) da galantamina, um inibidor da enzima

acetilcolinesterase, em ratos expostos ao consumo de frutose (Ali et al., 2015). Em estudo clínico com pacientes com SM tratados com galantamina, também houve aumento da atividade da SOD e da CAT, seguido da redução do dano oxidativo (Sangaletti et al., 2021).

A análise histopatológica do VE revelou que o grupo DF apresentou uma redução na área total do VE em comparação ao grupo controle, sugerindo remodelamento ventricular com possível perda de massa muscular e atrofia miocárdica, características da cardiomiopatia diabética. No grupo DFP essa redução foi menos acentuada, sugerindo que a piridostigmina apresentou um efeito protetor parcial. Esses efeitos benéficos sobre a morfologia e fibrose cardíaca podem ter ocorrido por meio do aumento da atividade colinérgica, reduzindo a inflamação e o estresse oxidativo no pela modulação da matriz extracelular, reduzindo a deposição de colágeno e pela melhora da função autonômica cardiovascular, promovendo maior estabilidade hemodinâmica (Bezerra et al., 2017; Gardim et al., 2021; Lu et al., 2018).

Esses achados corroboram com estudos anteriores que demonstram que o DM tipo 2 está associado ao acúmulo de colágeno no miocárdio, mesmo na fase pré-diabética, sugerindo que alterações metabólicas iniciais podem desencadear remodelamento cardíaco e que o não tratamento pode contribuir para rigidez ventricular e disfunção diastólica. Estudos mais recentes indicam que o DM induz remodelamento da matriz extracelular cardíaca, caracterizado pelo aumento da quantidade de colágeno (56%) no VE dos diabéticos comparados aos controles (Mizushige et al., 2000).

No presente estudo, a administração de piridostigmina no grupo DFP não foi capaz de reverter completamente as alterações na área do VE e na deposição de colágeno observados no grupo DF o que pode indicar que, em estágios avançados de disfunção autonômica associada ao DM, a eficácia da piridostigmina pode ser prejudicada.

A análise dos parâmetros morfométricos cardíacos revelou redução na espessura da parede posterior em diástole no grupo DF em comparação aos grupos controles (CF e CFP). Essa diminuição pode indicar um processo de remodelamento ventricular associado ao DM, caracterizado por alterações de morfologia e estrutura miocárdica que comprometem a função cardíaca (Bregagnollo et al., 2007).

Artigos demonstram que a piridostigmina pode exercer efeitos benéficos sobre a morfologia cardíaca. Em modelos experimentais a administração crônica de piridostigmina atenuou o espessamento da parede ventricular e reduziu o volume

ventricular, sugerindo uma ação protetora contra hipertrofia cardíaca (Lu et al., 2014). A piridostigmina também demonstrou modular positivamente a hipertrofia ventricular esquerda em ratos hipertensos espontâneos, promovendo adaptações morfológicas favoráveis no coração. Esses achados sugerem que a piridostigmina pode contribuir para a preservação da estrutura miocárdica, especialmente em condições de estresse hemodinâmico ou metabólico (Gardim et al., 2021; Lu et al., 2014; Rodrigues et al., 2024).

Portanto, enquanto a observação de redução na espessura da parede posterior do VE no grupo DF pode refletir um processo de remodelamento cardíaco associado ao DM, neste estudo a piridostigmina parece ter modificado esse parâmetro ainda que discretamente.

A análise dos parâmetros ecocardiográficos da função sistólica do VE revelou que não houve diferenças significativas entre os grupos. Os valores de fração de ejeção, fração de encurtamento e onda S' permaneceram semelhantes entre os grupos, indicando a preservação da função sistólica do VE em todos os grupos, cabendo aqui a ressalva de que mesmo no grupo controle tratado com frutose, os parâmetros de função sistólica, já se apresentam reduzidos em relação ao grupo controle sem frutose, conforme demonstrado no capítulo anterior.

Esses achados sugerem que, apesar das alterações metabólicas e estruturais associadas ao DM e ao consumo de frutose, a função sistólica do VE foi mantida reduzida. Artigos mostram que, em estágios iniciais do DM tipo 2, a função cardíaca pode ser preservada, enquanto alterações mais sutis podem ser detectadas através de técnicas ecocardiográficas mais avançadas como pelo strain cardíaco pela técnica de speckle-tracking, que avalia a deformação miocárdica de forma global. Em ratos com DM tipo 2, a fração de ejeção e a fração de encurtamento permaneceram inalteradas, enquanto parâmetros de strain estavam reduzidos, indicando disfunção subclínica (Qi et al., 2023; Silva et al., 2024).

A fim de avaliar a associação entre os mecanismos associados às disfunções observadas no modelo desenvolvido de DM tipo 2, testamos a correlação entre variáveis envolvendo os grupos DF e DFP. Neste contexto, evidenciamos que a Var IP apresentou correlações negativas com o dano à proteína (carbonilas) no tecido cardíaco ( $r=-0,71$ ) e com a deposição de colágeno do VE ( $r=-0,68$ ), sugerindo que a melhora da disfunção autonômica induzida pela PIR estava associada a menor dano oxidativo e consequente menor deposição de colágeno. Reforçando esta hipótese, a oxidação de proteínas

apresentou correlações positivas com a deposição de colágeno ( $r=0,59$ ) e com a massa do VE ( $r=0,60$ ), sugerindo que a redução do dano oxidativo induzido pela PIR impactou na fibrose e no remodelamento do VE. Adicionalmente, mostrando a coerência entre as avaliações de estresse oxidativo nestes grupos, a oxidação de proteínas foi positivamente correlacionada a concentração de peróxido de hidrogênio ( $r=0,64$ ) e com a lipoperoxidação ( $r=0,71$ ) no coração, reforçando a hipótese de melhora no balanço redox induzido pelo tratamento com PIR nos animais diabéticos. Por fim, a deposição de colágeno foi positivamente correlacionada com a massa do VE ( $r=0,58$ ), demonstrando que os animais com menor fibrose, apresentavam menor massa do VE.

Em conjunto nossos achados sugerem que o tratamento com PIR ao modular a disautonomia cardíaca no modelo de associação de STZ e consumo de frutose, possa reduzir o estresse oxidativo cardíaco, impactando em redução de fibrose e remodelamento ventricular. No entanto, estudos futuros poderiam avaliar os efeitos deste tratamento em diferentes tempos e doses a fim estudar efeitos mais marcantes na função cardíaca.

---

***CONCLUSÕES***

---

## **8 Conclusões**

Neste trabalho, foi possível estabelecer e caracterizar um modelo experimental de DM2, induzido pelo consumo crônico de frutose e administração de estreptozotocina, no qual analisou-se o efeito da estimulação colinérgica, por meio do tratamento com piridostigmina, sobre parâmetros cardiometabólicos e autonômicos. Os resultados obtidos nos permitem dizer: em conjunto, os resultados das análises do capítulo 1 indicam que a combinação de estreptozotocina em dose de 40 mg/kg e consumo excessivo de frutose está associado à alterações metabólicas (hiperglicemia, hipertrigliceridemia e resistência à insulina) disfunção autonômica cardiovascular e estresse oxidativo cardíaco, o que pode estar relacionado a maior comprometimento da função cardíaca, principalmente diastólica, nesse modelo de DM2. Neste sentido, estratégias terapêuticas que visem reduzir a ingestão de frutose e melhorar o controle glicêmico podem ser eficazes na mitigação do dano oxidativo, na fibrose cardíaca e consequente melhora da sua função e ainda na prevenção de complicação cardiovasculares em pacientes diabéticos.

Em relação ao tratamento com PI, em conjunto, nossos achados sugerem que ao modular a disautonomia cardíaca no modelo de associação de STZ e consumo de frutose, possa reduzir o estresse oxidativo cardíaco, impactando em redução de fibrose e remodelamento ventricular. No entanto, estudos futuros poderiam avaliar os efeitos deste tratamento em diferentes tempos e doses a fim estudar efeitos mais marcantes na função cardíaca.

***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, Ashok *et al.* The effects of oxidative stress on female reproduction: a review.

**Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, n. 1, p. 49, 2012.

AI, Jing *et al.* Mechanism of impaired baroreflex sensitivity in Wistar rats fed a high-fat and - carbohydrate diet. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 2, p. 291–297, 28 jul. 2010.

ALEN, Nicholas V. The cholinergic anti-inflammatory pathway in humans: State-of-the-art review and future directions. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 136, p. 104622, maio 2022.

ALI, Mennatallah A. *et al.* Antidiabetic Effect of Galantamine: Novel Effect for a Known Centrally Acting Drug. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0134648, 11 ago. 2015.

ALZAMENDI, Ana *et al.* Increased Male Offspring's Risk of Metabolic-Neuroendocrine Dysfunction and Overweight after Fructose-Rich Diet Intake by the Lactating Mother. **Endocrinology**, v. 151, n. 9, p. 4214–4223, 1 set. 2010.

ANAND SWARUP, KollaR. L. *et al.* Effect of dragon fruit extract on oxidative stress and aortic stiffness in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Pharmacognosy Research**, v. 2, n. 1, p. 31, 2010.

ANDRONE, A. S. Acetylcholinesterase inhibition with pyridostigmine improves heart rate recovery after maximal exercise in patients with chronic heart failure. **Heart**, v. 89, n. 8, p. 854–858, 1 ago. 2003.

ANGELIS, Katia De *et al.* Sympathetic overactivity precedes metabolic dysfunction in a fructose model of glucose intolerance in mice. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 8, p. R950–R957, 15 abr. 2012.

ARAGNO, Manuela *et al.* Oxidative Stress Impairs Skeletal Muscle Repair in Diabetic Rats. **Diabetes**, v. 53, n. 4, p. 1082–1088, 1 abr. 2004.

ARAGNO, Manuela *et al.* Oxidative Stress Triggers Cardiac Fibrosis in the Heart of Diabetic Rats. **Endocrinology**, v. 149, n. 1, p. 380–388, 1 jan. 2008.

ASMAT, Ullah; ABAD, Khan; ISMAIL, Khan. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 547–553, set. 2016.

AYALA, Julio E. *et al.* Considerations in the Design of Hyperinsulinemic-Euglycemic Clamps in the Conscious Mouse. **Diabetes**, v. 55, n. 2, p. 390–397, 1 fev. 2006.

BARBOZA, C. A. *et al.* Cholinergic Stimulation by Pyridostigmine Bromide Before Myocardial Infarction Prevent Cardiac and Autonomic Dysfunction. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 2481, 21 fev. 2019.

BARRIÈRE, David André *et al.* Combination of high-fat/high-fructose diet and low-dose streptozotocin to model long-term type-2 diabetes complications. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 424, 11 jan. 2018.

BASSI, Gabriel S. *et al.* Anatomical and clinical implications of vagal modulation of the spleen. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 112, p. 363–373, maio 2020.

BEHLING, Alice *et al.* Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces ventricular arrhythmia and enhances heart rate variability in heart failure. **American Heart Journal**, v. 146, n. 3, p. 494–500, set. 2003.

BELLÓ-KLEIN, A. *et al.* Myocardial Oxidative Stress and Antioxidants in Hypertension as a Result of Nitric Oxide Synthase Inhibition. **Cardiovascular Toxicology**, v. 1, n. 1, p. 43–50, 2001.

BENZIE, Iris F. F.; STRAIN, J. J. [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *In: [S.l.: S.n.]*. p. 15–27.

BERNARDES, Nathalia *et al.* Baroreflex Impairment Precedes Cardiometabolic Dysfunction in an Experimental Model of Metabolic Syndrome: Role of Inflammation and Oxidative Stress. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8578, 5 jun. 2018.

BEZERRA, Otávio C. *et al.* Cholinergic Stimulation Improves Oxidative Stress and Inflammation in Experimental Myocardial Infarction. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13687, 20 out. 2017.

BILATE, Angelina M. B. *et al.* The Syrian hamster as a model for the dilated cardiomyopathy of Chagas' disease: a quantitative echocardiographical and histopathological analysis. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 12, p. 1116–1124, out. 2003.

BONORA, ENZO *et al.* Estimates of In Vivo Insulin Action in Man: Comparison of Insulin Tolerance Tests with Euglycemic and Hyperglycemic Glucose Clamp Studies. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 68, n. 2, p. 374–378, fev. 1989.

BOUDINA, Sihem; ABEL, E. Dale. Diabetic Cardiomyopathy Revisited. **Circulation**, v. 115, n. 25, p. 3213–3223, 26 jun. 2007.

BOUTARI, Chrysoula; MANTZOROS, Christos S. A 2022 update on the epidemiology of obesity and a call to action: as its twin COVID-19 pandemic appears to be receding, the obesity and dysmetabolism pandemic continues to rage on. **Metabolism**, v. 133, p. 155217, ago. 2022.

BOVERIS, Alberto; CHANCE, Britton. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v. 134, n. 3, p. 707–716, 15 jul. 1973.

BREGAGNOLLO, Edson Antonio *et al.* Papel relativo da remodelação geométrica do ventrículo esquerdo, morfológica e funcional do miocárdio na transição da hipertrofia compensada para a falência cardíaca em ratos com estenose aórtica supraavalvar. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, n. 2, p. 225–233, fev. 2007.

BRITO, J. O. *et al.* Parasympathetic dysfunction is associated with insulin resistance in fructose-fed female rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 9, p. 804–808, 20 ago. 2008.

CASTRO, María Cecilia *et al.* Fructose-induced inflammation, insulin resistance and oxidative stress: A liver pathological triad effectively disrupted by lipoic acid. **Life Sciences**, v. 137, p. 1–6, set. 2015.

CASTRO, R. R. T. *et al.* Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces the QTc interval in coronary artery disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 6, p. 685–689, jun. 2002.

CHAO, Yung-Mei *et al.* Anomalous AMPK-regulated angiotensin AT1R expression and SIRT1-mediated mitochondrial biogenesis at RVLM in hypertension programming of offspring to maternal high fructose exposure. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 68, 23 dez. 2020.

CHENG, Hao *et al.* High fructose diet: A risk factor for immune system dysregulation. **Human Immunology**, v. 83, n. 6, p. 538–546, jun. 2022.

CONSOLIM-COLOMBO, Fernanda M. *et al.* Galantamine alleviates inflammation and insulin resistance in patients with metabolic syndrome in a randomized trial. **JCI insight**, v. 2, n. 14, 20 jul. 2017.

CONTI, Filipe Fernandes *et al.* Cardiovascular autonomic dysfunction and oxidative stress induced by fructose overload in an experimental model of hypertension and menopause. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 14, n. 1, p. 185, 11 dez. 2014.

CORONATI, Mattia *et al.* Added Fructose in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and in Metabolic Syndrome: A Narrative Review. **Nutrients**, v. 14, n. 6, p. 1127, 8 mar. 2022.

CRESCENZO, Raffaella *et al.* Fructose supplementation worsens the deleterious effects of short-term high-fat feeding on hepatic steatosis and lipid metabolism in adult rats. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 9, p. 1203–1213, 25 set. 2014.

CRUZ, Paula L. *et al.* Nicotinamide attenuates streptozotocin-induced diabetes complications and increases survival rate in rats: role of autonomic nervous system. **BMC Endocrine Disorders**, v. 21, n. 1, p. 133, 28 dez. 2021.

DALL'AGO, P. *et al.* Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 7, p. 843–849, jul. 2002.

DALL'AGO, Pedro *et al.* Parasympathetic dysfunction is associated with baroreflex and chemoreflex impairment in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 131, n. 1–2, p. 28–35, jan. 2007.

D'AVILA, Kátia De Angelis Lobo *et al.* Exercise Reverses Peripheral Insulin Resistance in Trained L-NAME–Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 34, n. 4, p. 768–772, out. 1999.

DE ANGELIS, K. *et al.* Improvement of circulatory control in trained diabetic rats: Role of baroreflex sensitivity and blood flow distribution. **Hypertension**, v. 40, n. 3, p. 407–407, 2002.

DE ANGELIS, K. L. D. *et al.* Exercise Training in Aging. **Hypertension**, v. 30, n. 3, p. 767–771, set. 1997.

DE ANGELIS, K. L. D. *et al.* Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 6, p. 635–641, jun. 2000.

DE LA FUENTE, Raquel N. *et al.* Cholinergic stimulation with pyridostigmine improves autonomic function in infarcted rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 40, n. 9, p. 610–616, 23 set. 2013.

DE MIRANDA, Victor Hugo Martins *et al.* Acetylcholinesterase Inhibitor Ameliorates Early Cardiometabolic Disorders in Fructose-Overloaded Rat Offspring. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 8, p. 1055, 10 ago. 2024.

DEKKER, J. M. *et al.* Heart Rate Variability from Short Electrocardiographic Recordings Predicts Mortality from All Causes in Middle-aged and Elderly Men: The Zutphen Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 145, n. 10, p. 899–908, 15 maio 1997.

DINICOLANTONIO, James J. *et al.* Fructose-induced inflammation and increased cortisol: A new mechanism for how sugar induces visceral adiposity. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 61, n. 1, p. 3–9, maio 2018.

DUPAS, Julie *et al.* Metabolic Syndrome and Hypertension Resulting from Fructose Enriched Diet in Wistar Rats. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–10, 2017.

ELSAYED, Nuha A. *et al.* 2. Diagnosis and Classification of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2025. **Diabetes Care**, v. 48, n. Supplement\_1, p. S27–S49, 1 jan. 2025.

ESPINOZA, Cristian; FUENZALIDA, Barbara; LEIVA, Andrea. Increased Fetal Cardiovascular Disease Risk: Potential Synergy Between Gestational Diabetes Mellitus and Maternal Hypercholesterolemia. **Current Vascular Pharmacology**, v. 19, n. 6, p. 601–623, nov. 2021.

FARAH, Vera *et al.* Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. **Autonomic Neuroscience**, v. 130, n. 1–2, p. 41–50, dez. 2006.

FARAH, Vera; ELASED, Khalid M.; MORRIS, Mariana. Genetic and dietary interactions: role of angiotensin AT1 receptors in response to a high-fructose diet. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 2, p. H1083–H1089, ago. 2007.

FERIANI, Daniele J. *et al.* Pyridostigmine Improves the Effects of Resistance Exercise Training after Myocardial Infarction in Rats. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 12 fev. 2018.

FLUES, Karin *et al.* Exercise training associated with estrogen therapy induced cardiovascular benefits after ovarian hormones deprivation. **Maturitas**, v. 65, n. 3, p. 267–271, mar. 2010.

FREITAS, Lorena Karen Paiva e *et al.* Obesidade em adolescentes e as políticas públicas de nutrição. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 6, p. 1755–1762, jun. 2014.

GARDIM, Camila B. *et al.* Effects of chronic cholinergic stimulation associated with aerobic physical training on cardiac morphofunctional and autonomic parameters in spontaneously hypertensive rats. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 17141, 25 ago. 2021.

GIACCO, Ferdinando; BROWNLEE, Michael. Oxidative Stress and Diabetic Complications. **Circulation Research**, v. 107, n. 9, p. 1058–1070, 29 out. 2010.

GOGAN, Alexandra *et al.* Cardiac Autonomic Neuropathy in Diabetes Mellitus: Pathogenesis, Epidemiology, Diagnosis and Clinical Implications: A Narrative Review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 14, n. 3, p. 671, 21 jan. 2025.

GOLDBERGER, Zachary D. *et al.* ACC/AHA/HRS Versus ESC Guidelines for the Diagnosis and Management of Syncope. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 74, n. 19, p. 2410–2423, nov. 2019.

GRANGER, Donald L. *et al.* [6] Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *In: [S.l.: S.n.]*. p. 49–61.

GUARINI, Salvatore *et al.* Efferent Vagal Fibre Stimulation Blunts Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation and Protects Against Hypovolemic Hemorrhagic Shock. **Circulation**, v. 107, n. 8, p. 1189–1194, 4 mar. 2003.

HANOVER, LM; WHITE, JS. Manufacturing, composition, and applications of fructose. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, n. 5, p. 724S-732S, nov. 1993.

HENRY, R. R.; CRAPO, P. A.; THORBURN, A. W. Current Issues in Fructose Metabolism. **Annual Review of Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 21–39, jul. 1991.

HUSTON, J. M.; TRACEY, K. J. The pulse of inflammation: heart rate variability, the cholinergic anti-inflammatory pathway and implications for therapy. **Journal of Internal Medicine**, v. 269, n. 1, p. 45–53, jan. 2011.

**IDF Diabetes Atlas. 12. Brussels: International Diabetes Federation.** International Diabetes Federation, , 2021. Disponível em: <[https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2021/07/IDF\\_Atlas\\_10th\\_Edition\\_2021.pdf](https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2021/07/IDF_Atlas_10th_Edition_2021.pdf)>. Acesso em: 27 maio. 2025

IRIGOYEN, Maria-Cláudia *et al.* Exercise Training Improves Baroreflex Sensitivity Associated With Oxidative Stress Reduction in Ovariectomized Rats. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 998–1003, out. 2005.

JIA, Guanghong; SOWERS, James R. Hypertension in Diabetes: An Update of Basic Mechanisms and Clinical Disease. **Hypertension**, v. 78, n. 5, p. 1197–1205, nov. 2021.

JOHNSON, Richard J. *et al.* Sugar, Uric Acid, and the Etiology of Diabetes and Obesity. **Diabetes**, v. 62, n. 10, p. 3307–3315, 1 out. 2013.

JUNOD, Alain *et al.* Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 11, p. 2129–2139, 1 nov. 1969.

JÜRGENS, Hella *et al.* Consuming Fructose-sweetened Beverages Increases Body Adiposity in Mice. **Obesity Research**, v. 13, n. 7, p. 1146–1156, 6 jul. 2005.

KAHN, Steven E.; COOPER, Mark E.; DEL PRATO, Stefano. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. **The Lancet**, v. 383, n. 9922, p. 1068–1083, mar. 2014.

KAHN, Steven E.; HULL, Rebecca L.; UTZSCHNEIDER, Kristina M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840–846, 13 dez. 2006.

KAY PARKER; MICHELLE SALAS; VERONICA C. NWOSU. High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 5, n. 5, p. 71–78, 2010.

KELLEY, Glen L.; ALLAN, Geoffrey; AZHAR, Salman. High Dietary Fructose Induces a Hepatic Stress Response Resulting in Cholesterol and Lipid Dysregulation. **Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 548–555, fev. 2004.

KHOSRAVI-BOROJENI, Hossein *et al.* Does the impact of metabolic syndrome on cardiovascular events vary by using different definitions? **BMC Public Health**, v. 15, n. 1, p. 1313, 29 dez. 2015.

KILKENNY, Carol *et al.* Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 1, n. 2, p. 94–99, 1 dez. 2010.

KONDO, Hidekazu *et al.* Interleukin-10 treatment attenuates sinus node dysfunction caused by streptozotocin-induced hyperglycaemia in mice. **Cardiovascular Research**, v. 115, n. 1, p. 57–70, 1 jan. 2019.

LA ROVERE. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. **Lancet**, v. 351, p. 478–484, 1998.

LATARO, Renata M. *et al.* Increase in parasympathetic tone by pyridostigmine prevents ventricular dysfunction during the onset of heart failure. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 8, p. R908–R916, 15 out. 2013.

LEE, Mi Young *et al.* Short Insulin Tolerance Test Can Determine the Effects of Thiazolidinediones Treatment in Type 2 Diabetes. **Yonsei Medical Journal**, v. 49, n. 6, p. 901, 2008.

LEHNEN, Alexandre M. *et al.* Cardiovascular Changes in Animal Models of Metabolic Syndrome. **Journal of Diabetes Research**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

LEVY, Matthew N. Sympathetic-Parasympathetic Interactions in the Normal Heart. *In: [S.l.: S.n.]*. p. 137–148.

LIN, Yi; SUN, Zhongjie. Current views on type 2 diabetes. **Journal of Endocrinology**, v. 204, n. 1, p. 1–11, jan. 2010.

LU, Yi *et al.* Pyridostigmine Ameliorates Cardiac Remodeling Induced by Myocardial Infarction via Inhibition of the Transforming Growth Factor- $\beta$ 1/TGF- $\beta$ 1-Activated Kinase Pathway. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 63, n. 5, p. 412–420, maio 2014.

LU, Yi *et al.* Pyridostigmine protects against cardiomyopathy associated with adipose tissue browning and improvement of vagal activity in high-fat diet rats. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 4, p. 1037–1050, abr. 2018.

MAEDA, C. Y. *et al.* Autonomic Dysfunction in Short-term Experimental Diabetes. **Hypertension**, v. 26, n. 6, p. 1100–1104, dez. 1995.

- MALAFAIA, Andressa Bressan *et al.* Indução de obesidade com sacarose em ratos. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 26, n. suppl 1, p. 17–21, 2013.
- MARKLUND, Stefan L. *et al.* Superoxide dismutase activity in brains from chronic alcoholics. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 12, n. 3, p. 209–215, nov. 1983.
- MARTÍN-TIMÓN, Iciar. Type 2 diabetes and cardiovascular disease: Have all risk factors the same strength? **World Journal of Diabetes**, v. 5, n. 4, p. 444, 2014.
- MASIELLO, Pellegrino *et al.* Experimental NIDDM: Development of a New Model in Adult Rats Administered Streptozotocin and Nicotinamide. **Diabetes**, v. 47, n. 2, p. 224–229, 1 fev. 1998.
- MASSIMO PAGANI *et al.* Spectral analysis of RR and arterial pressure variabilities to assess sympatho-vagal interaction during mental stress in humans. **Journal of Hypertension**, v. 7, n. 6, p. S14-15, 1989.
- MATOUGH, Fatmah A. *et al.* The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Complications = دور مضاعفات في للأكسدة المضادة المواد و التأكسدي الإجهاد دور. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v. 12, n. 1, p. 5–18, fev. 2012.
- MIZUSHIGE, Katsufumi *et al.* Alteration in Left Ventricular Diastolic Filling and Accumulation of Myocardial Collagen at Insulin-Resistant Prediabetic Stage of a Type II Diabetic Rat Model. **Circulation**, v. 101, n. 8, p. 899–907, 29 fev. 2000.
- MOCK, Kaitlin *et al.* High-fructose corn syrup-55 consumption alters hepatic lipid metabolism and promotes triglyceride accumulation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 39, p. 32–39, jan. 2017.
- MONTEIRO, C. A. *et al.* **Vigitel Brasil 2015: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2015. [S.l.: S.n.]**

MORVAN, Eduardo *et al.* Metabolic, hemodynamic and structural adjustments to low intensity exercise training in a metabolic syndrome model. **Cardiovascular Diabetology**, v. 12, n. 1, p. 89, 18 dez. 2013.

NAKAGAWA, Takahiko *et al.* Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 1, n. 2, p. 80–86, dez. 2005.

NASCIMENTO, André F. *et al.* A Hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in wistar rats. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 968–974, ago. 2008.

NOVELLI, E. L. B. *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 111–119, 1 jan. 2007.

O. H. LOWRY *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

OGDEN, Cynthia L. *et al.* Consumption of sugar drinks in the United States, 2005-2008. **NCHS data brief**, n. 71, p. 1–8, ago. 2011.

OHKAWA, Hiroshi; OHISHI, Nobuko; YAGI, Kunio. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, jun. 1979.

OKAMOTO, Luis E. *et al.* Clinical Correlates of Efficacy of Pyridostigmine in the Treatment of Orthostatic Hypotension. **Hypertension**, v. 82, n. 3, p. 489–497, mar. 2025.

OLOKOBA, Abdulfatai B.; OBATERU, Olusegun A.; OLOKOBA, Lateefat B. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. **Oman Medical Journal**, v. 27, n. 4, p. 269–273, 16 jul. 2012.

PAGANI, Massimo *et al.* Spectral analysis of heart rate variability in the assessment of autonomic diabetic neuropathy. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 23, n. 2, p. 143–153, ago. 1988.

- PARK, Jung Hyun *et al.* Amelioration of High Fructose-Induced Cardiac Hypertrophy by Naringin. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9464, 21 jun. 2018.
- PAVLOV, Valentin A.; TRACEY, Kevin J. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 19, n. 6, p. 493–499, nov. 2005.
- PETHEŐ, Gábor L.; SZELES, Zsolt; GEISZT, Miklós. NADPH oxidase 5: Where are we now and which way to proceed? **Redox Biochemistry and Chemistry**, v. 9, p. 100036, ago. 2024.
- PICK, Edgar; KEISARI, Yona. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, v. 38, n. 1–2, p. 161–170, nov. 1980.
- PIRES, Mara D. *et al.* Noninvasive Assessment of Hemodynamic Parameters in Experimental Stenosis of the Ascending Aorta. **Artificial Organs**, v. 27, n. 8, p. 695–700, 13 ago. 2003.
- PRENTKI, M. Islet cell failure in type 2 diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1802–1812, 3 jul. 2006.
- PUENTE-RUIZ, Stephanie C.; JAIS, Alexander. Reciprocal signaling between adipose tissue depots and the central nervous system. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 16 set. 2022.
- QI, Yanchao *et al.* Speckle-tracking echocardiography provides sensitive measurements of subtle early alterations associated with cardiac dysfunction in T2DM rats. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 23, n. 1, p. 266, 22 maio 2023.
- REZNICK, Abraham Z.; PACKER, Lester. [38] Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *In: [S.l.: S.n.]*. p. 357–363.
- RIBEIRO, Robespierre Q. C. *et al.* Additional cardiovascular risk factors associated with excess weight in children and adolescents: the Belo Horizonte heart study. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 86, n. 6, 1 jun. 2006.

RICHTSFELD, Martina *et al.* Prolonged Administration of Pyridostigmine Impairs Neuromuscular Function with and without Down-regulation of Acetylcholine Receptors. **Anesthesiology**, v. 119, n. 2, p. 412–421, ago. 2013.

RIVERA, Juan Ángel *et al.* Childhood and adolescent overweight and obesity in Latin America: a systematic review. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 2, n. 4, p. 321–332, abr. 2014.

ROCHA, Juraci Aparecida *et al.* Increase in cholinergic modulation with pyridostigmine induces anti-inflammatory cell recruitment soon after acute myocardial infarction in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 310, n. 8, p. R697–R706, 15 abr. 2016.

RODRIGUES, Karine Pereira *et al.* Chronic acetylcholinesterase inhibition reduces the effects of physical training on ventricular contractility and coronary bed reactivity in hypertensive rats. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 21434, 13 set. 2024.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, Pilar *et al.* Implication of Oxidative Stress in Fetal Programming of Cardiovascular Disease. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 23 maio 2018.

ROLO, Anabela P.; PALMEIRA, Carlos M. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 212, n. 2, p. 167–178, abr. 2006.

RUBINO, Francesco *et al.* Definition and diagnostic criteria of clinical obesity. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 13, n. 3, p. 221–262, mar. 2025.

RUTGEERTS, P.; VAN ASSCHE, G.; VERMEIRE, S. Review article: infliximab therapy for inflammatory bowel disease – seven years on. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 23, n. 4, p. 451–463, 20 fev. 2006.

SAKLAYEN, Mohammad G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. **Current Hypertension Reports**, v. 20, n. 2, p. 12, 26 fev. 2018.

SALEMI, V. *et al.* Reference values from M-mode and Doppler echocardiography for normal Syrian hamsters. **European Journal of Echocardiography**, v. 6, n. 1, p. 41–46, jan. 2005.

- SAMUEL, Renata O. *et al.* Streptozotocin-induced rodent models of diabetes: Protocol comparisons. *In: Elizabeth GL (ed) Streptozotocin: Uses, mechanism of action and side effects.* New York: New York: Nova Science Publishers, 2014. p. 61–80.
- SANGALETI, Carine Teles *et al.* The Cholinergic Drug Galantamine Alleviates Oxidative Stress Alongside Anti-inflammatory and Cardio-Metabolic Effects in Subjects With the Metabolic Syndrome in a Randomized Trial. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 11 mar. 2021.
- SATAPATHY, Sanjaya K. *et al.* Galantamine Alleviates Inflammation and Other Obesity-Associated Complications in High-Fat Diet-Fed Mice. **Molecular Medicine**, v. 17, n. 7–8, p. 599–606, 1 jul. 2011.
- SCHAAN, B. D. *et al.* Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, p. 1895–1902, dez. 2004.
- SENGES, J. Altered cardiac automaticity and conduction in experimental diabetes mellitus. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 12, n. 12, p. 1341–1351, dez. 1980.
- SHAPIRO, Alexandra *et al.* Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 295, n. 5, p. R1370–R1375, nov. 2008.
- SILVA, Jessica *et al.* Realistic Aspects of Cardiac Ultrasound in Rats: Practical Tips for Improved Examination. **Journal of Imaging**, v. 10, n. 9, p. 219, 6 set. 2024.
- SLOBODA, Deborah M. *et al.* Early Life Exposure to Fructose and Offspring Phenotype: Implications for Long Term Metabolic Homeostasis. **Journal of Obesity**, v. 2014, p. 1–10, 2014.
- SOARES, Pedro Paulo da Silva *et al.* Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 113, n. 1–2, p. 24–31, jun. 2004.

SOUZA, Silvia B. C. *et al.* Role of Exercise Training in Cardiovascular Autonomic Dysfunction and Mortality in Diabetic Ovariectomized Rats. **Hypertension**, v. 50, n. 4, p. 786–791, out. 2007.

STRUNZ, Célia Maria Cássaro *et al.* Resveratrol Attenuates Fibrosis and Alters Signaling Pathways in Diabetic Cardiac and Skeletal Muscles and Adipose Tissue Without Reversing Structural Damage. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 4, p. 1672, 15 fev. 2025.

SWIRSKI, Filip K. *et al.* Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 27, p. 10340–10345, 5 jul. 2006.

TAIN, You-Lin; CHAN, Julie; HSU, Chien-Ning. Maternal Fructose Intake Affects Transcriptome Changes and Programmed Hypertension in Offspring in Later Life. **Nutrients**, v. 8, n. 12, p. 757, 25 nov. 2016.

TAPPY, Luc; LÊ, Kim-Anne. Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 1, p. 23–46, jan. 2010.

TASKINEN, M. -R. *et al.* Adverse effects of fructose on cardiometabolic risk factors and hepatic lipid metabolism in subjects with abdominal obesity. **Journal of Internal Medicine**, v. 282, n. 2, p. 187–201, 27 ago. 2017.

TAYE, Ashraf; ABOUZIED, Mekky M.; MOHAFAZ, Omar M. M. Tempol ameliorates cardiac fibrosis in streptozotocin-induced diabetic rats: role of oxidative stress in diabetic cardiomyopathy. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 386, n. 12, p. 1071–1080, 16 dez. 2013.

THORP, Alicia A.; SCHLAICH, Markus P. Relevance of Sympathetic Nervous System Activation in Obesity and Metabolic Syndrome. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

TOMLINSON KC *et al.* Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. **Pharmacol Rev**, v. 44, p. 103–48, 1981.

TRACEY, Kevin J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853–859, dez. 2002.

TRACEY, Kevin J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 2, p. 289–296, 1 fev. 2007.

TRAN, Linda T.; YUEN, Violet G.; MCNEILL, John H. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 332, n. 1–2, p. 145–159, 18 dez. 2009.

TSUJI, H. *et al.* Reduced heart rate variability and mortality risk in an elderly cohort. The Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 90, n. 2, p. 878–883, ago. 1994.

TUNC-ATA, Melek *et al.* Ileal interposition improves metabolic syndrome parameters in a rat model of metabolic syndrome induced by monosodium glutamate. **Life Sciences**, v. 266, p. 118846, fev. 2021.

VAN DE WEIJER, Tineke; SCHRAUWEN-HINDERLING, Vera B.; SCHRAUWEN, Patrick. Lipotoxicity in type 2 diabetic cardiomyopathy. **Cardiovascular Research**, v. 92, n. 1, p. 10–18, 1 out. 2011.

VOLANS, A. P. Sarin: guidelines on the management of victims of a nerve gas attack. **Emergency Medicine Journal**, v. 13, n. 3, p. 202–206, 1 maio 1996.

VOS, Miriam B. *et al.* Dietary fructose consumption among US children and adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Medscape journal of medicine**, v. 10, n. 7, p. 160, 9 jul. 2008.

WANG, Hong *et al.* Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. **Nature Medicine**, v. 10, n. 11, p. 1216–1221, 24 nov. 2004.

WEI, Yongzhong *et al.* Angiotensin II-induced NADPH Oxidase Activation Impairs Insulin Signaling in Skeletal Muscle Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 46, p. 35137–35146, nov. 2006.

WICHI, Rogério *et al.* Noninvasive and invasive evaluation of cardiac dysfunction in experimental diabetes in rodents. **Cardiovascular Diabetology**, v. 6, n. 1, p. 14, 26 dez. 2007.

WINZELL, Maria Sörhede; AHRÉN, Bo. The High-Fat Diet–Fed Mouse. **Diabetes**, v. 53, n. suppl\_3, p. S215–S219, 1 dez. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications : report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus**. Disponível em: <<https://iris.who.int/handle/10665/66040>>. Acesso em: 27 maio. 2025.

XIA, Xuejuan *et al.* Effect of Whole Grain Qingke (Tibetan *Hordeum vulgare* L. Zangqing 320) on the Serum Lipid Levels and Intestinal Microbiota of Rats under High-Fat Diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 13, p. 2686–2693, 5 abr. 2017.

ZHANG, Yan-Bo *et al.* High fructose causes cardiac hypertrophy via mitochondrial signaling pathway. **American journal of translational research**, v. 8, n. 11, p. 4869–4880, 2016.

ZHAO, Gang *et al.* Possible Role of Interleukin-1 $\beta$  in Type 2 Diabetes Onset and Implications for Anti-inflammatory Therapy Strategies. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 8, p. e1003798, 28 ago. 2014.

ZOU, Mi *et al.* Fructose consumption during pregnancy and lactation induces fatty liver and glucose intolerance in rats. **Nutrition Research**, v. 32, n. 8, p. 588–598, ago. 2012.