



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIENCIAS DA SAUDE - FACULDADE DE MEDICINA
INSTITUTO DO CORAÇÃO EDSON SAAD
Programa de Pós-Graduação em Cardiologia
Laboratório de Cardioimunologia

Ainhoa Rodriguez de Yurre Guirao

**ESTUDO DO REMODELAMENTO ELÉTRICO E MECÂNICO CARDÍACO EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO II**

Rio de Janeiro

Novembro de 2018

Ainhoa Rodriguez de Yurre

**ESTUDO DO REMODELAMENTO ELÉTRICO E MECÂNICO CARDÍACO EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO II**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Cardiologia) do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina e do Instituto do Coração Edson Saad, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Ciências Cardiovasculares.

Orientador: Prof. Dr. Emiliano Medei

Co-Orientador: Prof. Dr. Oscar Casis Sáenz

Rio de Janeiro

Novembro de 2018

CIP – Catalogação na Publicação

Guirao, Ainhoa Rodriguez de Yurre

Estudo do remodelamento elétrico e mecânico cardíaco em um modelo experimental de diabetes tipo II / Ainhoa Rodrigues de Yurre Guirao. – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2018.

104 f.; 31 cm.

Orientador: Emiliano Medei

Co-orientador: Oscar Casis Sáenz

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Instituto do Coração Edson Saad, Programa de Pós-Graduação em Cardiologia, 2018.

Referências bibliográficas: f.71 – 81.

1. Diabetes Mellitus Tipo 2. 2. Disfunção Cardíaca. 3. Função Mitocondrial. 4. Resposta Imune Inata. 5. Estudos Experimentais. 6. Animais. 7. Camundongos. 8. Masculino. 9. Cardiologia - Tese. I. Medei, Emiliano. II. Sáenz, Oscar Casis. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Instituto do Coração Edson Saad, Programa de Pós-Graduação em Cardiologia. IV. Título.

ESTUDO DO REMODELAMENTO ELÉTRICO E MECÂNICO CARDÍACO EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO II

Ainhoa Rodriguez de Yurre Guirao

Orientadores: Prof. Dr. Emiliano Medei e Prof. Dr. Oscar Casis Sáenz

Tese submetida ao Corpo Docente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Medicina (Cardiologia).

Aprovada por:

Gláucia Maria Moraes de Oliveira

Roberto Coury Pedrosa

José Hamilton Matheus Nascimento

Karen de Jesus Oliveira

Andrea Claudia Freitas Ferreira

Rio de Janeiro

Novembro de 2018



Ziren haietatik izatera gatoz

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por estar sempre ao meu lado me-apoiando em todas as minhas decisões. Pelo carinho incondicional, valores, paciência, motivação e por acreditar sempre em mim. Tudo o que sou é graças a vocês.

Aos meus irmãos Iñigo e Olatz, pelo carinho e cumplicidade em tudo momento, pelo apoio e encorajamento e por serem um exemplo para mim.

A toda la tropa Guiraotegi, em especial minha avó “amoña”, grande exemplo de ser humano maravilhoso (sabes una cosa?). Aos meus tios Javi e Estela, Maite e Iñaki, Tintxo e Inés, Ramontxo e Marisa, Iñigo e Donna; obrigada por todo o carinho, apoio e torcida. Aos meus primos Maitetxu e Aritz, Itziar, Aitor, Debora, Juncal, Iñaki e Catrien, Jon e Itziar, e ao pequeno da família Izei. Obrigada por me mostrar a fortuna de ter a melhor família do mundo. Vocês são meu orgulho!

Aos meus amigos Ane, Nagore, Aitzi, Hebe e Gorka, obrigada por me mostrar que amizade não entende de distancias e que passe o que passe sempre posso contar com vocês mesmo estando a milhares de km. Mila esker bihotz-bihotzez akaritos!

A minha família argentina Mica, Pipi, Alo e Juli. Palavras são poucas para agradecer esses anos de amizade e me mostrar que família não precisa ser de sangue. Por todos os momentos inesquecíveis vividos juntas. Estarei sempre agradecida por encontrar vocês no meu caminho.

Aos amigos que fiz nesses anos no Rio, Layse, Fer, Esteban, Clari, Sol, Maxi, Marian, Marcos, Luiz, Gabi e Juanito. Obrigada por enriquecer minha vida. A Mara e Robson, por me acolherem tão bem na sua casa quando cheguei no Rio.

Ao meu orientador Emiliano Medei, por me dar a oportunidade de crescer tanto profissional como pessoalmente, por confiar em mim e por me transmitir a paixão pela pesquisa. Muito obrigada pela paciência, carinho e aprendizado e por me apoiar e encorajar sempre fazendo possível a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Oscar Casis. Muito obrigada por me acolher no seu laboratório e me dar a confiança para seguir em frente. Por me apoiar e encorajar mesmo na distância, e por me introduzir no mundo da eletrofisiologia. Obrigada pelo aprendizado e carinho ao longo destes anos.

Ao professor Ariel Escobar, por me mostrar que curiosidade não tem fim e que querer é poder. Muito obrigada pelo carinho e aprendizado tanto no Rio quanto na minha estadia no teu laboratório na Universidade de Califórnia, e por abrir as portas da sua casa junto com Tania e Pinky.

Aos colegas do Laboratório de Cardiomunologia, Mica, Thabata, Ygor, Bruno, Oscar, Duda, Dayvid, Julia e Guilherme. Obrigada pela amizade e parceria brindada ao longo destes anos e por acompanhar e participar neste projeto. Obrigada por formar parte da minha família científica.

Aos membros do Laboratório de Eletrofisiologia da faculdade de Farmácia de Vitoria-Gasteiz, em especial a Oscar, Juanma, Mónica e Julian. Muito obrigada pelo carinho e ajuda sempre que eu precisei. Obrigada Juanma por ser essa pessoa incrível sempre disposta a ajudar e dar conselhos.

Obrigada aos membros do Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca e do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular por toda ajuda brindada.

Aos bioteristas, tanto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho quanto do CENABIO. Obrigada por cuidar dos nossos “bichinhos” e fazer possível o nosso trabalho.

Aos membros da banca, por aceitar participar na mesma aportando sugestões, conselhos e conhecimento.

Agradeço a todos os colaboradores que fizeram possível o desenvolvimento deste trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Cardiologia da UFRJ, pela oportunidade de desenvolver este projeto, e em especial a coordenadora Glaucia de Oliveira por tudo o apoio e incentivo fornecido nesses anos.

Agradeço ao Governo do Brasil, governo do Rio de Janeiro e a agência de fomento CAPES por subsidiar minha formação.

RESUMO

RODRIGUEZ DE YURRE, Ainhoa. **Estudo do remodelamento elétrico e mecânico cardíaco em um modelo experimental de diabetes tipo II**. Rio de Janeiro, 2018. Tese (Doutorado em Ciências cardiovasculares). Faculdade de Medicina e Instituto do Coração Edson Saad da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Introdução: O diabetes tipo 2 (DT2) é a forma mais prevalente de diabetes e representa cerca de 90% dos casos de diabetes no mundo. Como consequência do estilo de vida e alimentação, esta síndrome transformou-se em um dos maiores problemas de saúde. Ele é associado com aumento do aparecimento de acometimentos cardiovasculares os quais podem levar a alterações metabólicas, mecânicas ou elétricas.

Objetivo: Estudar os mecanismos envolvidos no remodelamento elétrico, mecânico e metabólico cardíaco em um modelo murino de DT2 que combina uma dieta hipercalórica (HFD, 45% de gordura) e baixas doses de estreptozotocina (STZ), e estudar o papel da resposta imune inata nesta doença.

Métodos: Camundongos C57BL/6 machos adultos foram distribuídos em 4 grupos: WT CNTRL (grupo controle), WT HFD (grupo com adição de HFD) WT STZ (grupo com 2 injeções de STZ, 40 mg/kg separadas 24h) e WT DT2 (grupo com HFD e 2 injeções de STZ). Após 6 semanas do início do tratamento, foram aferidos os níveis de glicose em sangue e os níveis séricos de insulina. Também foram realizados os testes intraperitoneais de tolerância à glicose (IPGTT) e de tolerância à insulina (IPITT) para conferir a resistência à insulina. A atividade elétrica do coração foi estudada tanto *in vivo* quanto *ex vivo* mediante eletrocardiograma (ECG) e potencial de ação (PA) respectivamente e a densidade da corrente transitória de K^+ (I_{to}) foi estudada mediante Patch clamp. Em simultâneo aos registros do PA, foram estudados os transitórios de Ca^{2+} . A vulnerabilidade a desenvolver arritmias cardíacas foi avaliada mediante um protocolo *in vivo* que combina cafeína (120 mg/kg i.p) e dobutamina (50 μ g/kg i.v) e mediante um protocolo *ex vivo* de estimulação S1-S2. A função ventricular foi avaliada mediante ressonância magnética nuclear (RMN) e a atividade mitocondrial foi estudada avaliando o consumo de O_2 e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Para estudar o papel do sistema imune, camundongos *knock out* (KO) para NLRP3, CASP1 e IL-1R foram induzidos a DT2 e foram avaliados os parâmetros tanto e elétricos quanto mecânicos.

Resultados: 6 semanas de HFD e 2 injeções de STZ 2 semanas após do início da dieta conseguiram reproduzir o estado metabólico do DT2. Os resultados mostram prolongamento do intervalo QJ no ECG dos animais DT2 quando comparados aos animais CTRL ($24,99 \pm 0,2$ ms, Vs. $21,29 \pm 0,3$ ms; $p < 0,001$) e aumento do APD90 ($79,2 \pm 1,4$ Vs. $85,1 \pm 1,8$; $p < 0,05$), o qual pode ser explicado, pelo menos em parte, pela diminuição da corrente I_{to} . Os animais DT2 apresentam maior susceptibilidade e severidade a arritmias cardíacas que os CTRL. A cinética do manejo do Ca^{2+} está comprometida nos animais DT2 e a função ventricular dos DT2 mostrou menor porcentagem de fração de ejeção ($56,81 \pm 0,9$ %, Vs. $78,74 \pm 1,4$ %; $p < 0,001$). Enquanto a função mitocondrial, o consumo de O_2 nos animais DT2 está diminuído devido a uma redução do conteúdo mitocondrial e a produção de H_2O_2

também está diminuída. Finalmente, os animais KO T2D para NLRP3, CASP1 e IL-1R não conseguiram reverter as alterações elétricas observadas nos animais WT.

Conclusões: O Protocolo aqui utilizado foi capaz de reproduzir um modelo de DT2; o aumento do intervalo QJ observado nos animais DT2 pode ser explicado, pelo menos em parte, pela diminuição da corrente Ito; os animais DT2 mostraram maior susceptibilidade a arritmias cardíacas; a função ventricular nos animais DT2 está comprometida, observando-se menor %FE. A falta de moléculas chave para o sistema imune inato, tal como NLRP3, CASP1 ou IL-1R, não interferiu na indução de DT2; e o sistema imune inato, pelo menos a via do inflamassoma NLRP3, parece não estar envolvida nas alterações elétricas aqui observadas.

Palavras chave: Diabetes tipo 2, disfunção cardíaca, função mitocondrial, resposta imune inata.

ABSTRACT

RODRIGUEZ DE YURRE, Ainhoa. **Cardiac electrical and mechanical remodeling study on a type II diabetes experimental model.** Rio de Janeiro, 2018. PhD thesis (Cardiovascular sciences). Faculty of Medicine and Edson Saad Heart Institute of Federal University of Rio de Janeiro.

Introduction: Type 2 diabetes (T2D) is the most prevalent form of diabetes and represents about 90% of the diabetic cases all over the world. As a consequence of the lifestyle and feeding, this syndrome has turned into one of the largest health problems worldwide and it is associated with an increase of premature appearance of several disorders such as cardiovascular complications, which can evoke cardiac electrical, mechanical or metabolic disturbances as arrhythmias.

Aim: Investigate the mechanisms underlying the cardiac electrical, mechanical and metabolic remodeling on type 2 diabetes (T2D) mice model which combines a high fat diet (HFD) and low doses of streptozotocin (STZ), and to study the role of the innate immune response on this disease.

Methods: Adult C57BL/6 male mice were distributed on 4 groups: WT CNTRL (control group), WT HFD (group with addition of hypercaloric diet with 45% of fat), WT STZ (group with 2 STZ injections) and WT T2D (group with HFD and 2 STZ injections). After 6 weeks of dietary establishment, blood glucose levels and serum insulin levels were measured. Also, intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests (IPGTT and IPITT respectively) were carried out to confirm insulin resistance. Cardiac electrical activity was studied *in vivo* and *ex vivo* through electrocardiogram (EKG) and action potential (AP) respectively, and K⁺ outward transient current (I_{to}) was measured through Patch clamp technique. Simultaneously to AP recordings, Ca²⁺ transients were recorded. Cardiac arrhythmia susceptibility and vulnerability was studied by a *in vivo* protocol combining caffeine (120 mg/kg i.p) and dobutamine (50 µg/kg i.v), and *ex vivo* stimulation protocol. Ventricular function was evaluated by nuclear magnetic resonance (NMR). Mitochondrial activity was studied measuring oxidative phosphorylation and oxygen reactive species (ROS) production. Finally, to investigate the role of the immune innate system, knock out (KO) mice for NLRP3, Casp1 and IL-1R were induced to T2D and either electrical and mechanical parameters were evaluated.

Results: Blood glucose levels, intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT), intraperitoneal insulin tolerance test (IPITT) and serum insulin levels were used to confirm T2D after 6 weeks of HFD and 2 STZ injections 2 weeks after dietary establishment. *In vivo* EKG recordings showed prolonged QJ interval on T2D mice compared to CNTRL group (24,99 ± 0,2 ms, Vs. 21,29 ± 0,3 ms; p < 0,001) which can be explained at least partially, by longer APD90 (79,2 ± 1,4 Vs. 85,1 ± 1,8; p < 0,05), and transient outward potassium current (I_{to}) decrease. In addition, T2D mice showed not only more susceptibility but also arrhythmia severity. Furthermore, ventricular function was studied by magnetic resonance imaging (MRI-7T), which showed ejection fraction percentage diminution on diabetic mice (56,81 ± 0,9 %, Vs. 78,74 ± 1,4 %; p < 0,001). Regarding to mitochondrial function, O₂ consumption on T2D mice was lower due to mitochondrial content diminution and H₂O₂ production was also lower on T2D animals. Finally, NLRP3, CASP1 and IL-1R T2D KO mice were not able to revert the cardiac electrical alterations observed on WT animals.

Conclusions: The protocol used here was able to reproduce a T2D model. The QJ prolongation observed on T2D mice could be explained, at least in part, by Ito current diminution; T2D animals showed more arrhythmia susceptibility and ventricular function was impaired observing lower EF %. The lack of key molecules of innate immune system as NLRP3, CASP1 or IL-1R, didn't interfere on T2D induction and, the innate immune system, at least, NLRP3 pathway, is not involved on cardiac electrical alterations observed here.

Key words: Type 2 diabetes, cardiac dysfunction, mitochondrial function, innate immune response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	As 10 causas principais de morte no mundo no ano 2016	1
Figura 2	Distribuição mundial da população afetada pelo DM	2
Figura 3	Papiro de Ebers	3
Figura 4	Sequência de aminoácidos de insulina humana	6
Figura 5	Representação de um registro de potencial de ação cardíaco do ventrículo esquerdo sadio vs diabético	8
Figura 6	Representação da ativação do inflamossoma NLRP3	12
Figura 7	Desenho experimental	19
Figura 8	Registro de eletrocardiograma em camundongo C57bl/6 controle na derivação I	22
Figura 9	Esquema do sistema de perfusão retrograda de Langendorff	26
Figura 10	Diagrama esquemático do PLFFM	27
Figura 11	Diagrama da configuração <i>whole-cell</i> da técnica de Patch clamp	28
Figura 12	A combinação da HFD e baixa dose de STZ reproduz as alterações metabólicas do DT2	37
Figura 13	A combinação da HFD e baixa dose de STZ induz resistência à insulina	39
Figura 14	A combinação da HFD e baixa dose de STZ não altera a função renal	40
Figura 15	O DT2 prolonga a duração do intervalo QJ	41
Figura 16	Traçados representativos de potencial de ação e transiente de cálcio no grupo controle e DT2 no ventrículo	43
Figura 17	O DT2 prolongou a duração do potencial de ação e diminuiu o tempo de receptação do cálcio no ventrículo	44
Figura 18	O DT2 diminui a densidade da corrente Ito	45
Figura 19	O DT2 aumenta a susceptibilidade a desenvolver arritmias <i>in vivo</i>	46

Figura 20	O DT2 produz aumento de eventos arrítmicos ventriculares <i>ex vivo</i>	47
Figura 21	Traçados representativos de potencial de ação e transiente de cálcio no grupo controle e DT2 no átrio	48
Figura 22	O DT2 diminuiu a duração do potencial de ação e o tempo de receptação de cálcio no átrio	49
Figura 23	O DT2 produz aumento de eventos arrítmicos atriais	50
Figura 24	O DT2 produz uma disfunção ventricular sistólica	51
Figura 25	O DT2 diminui o consumo de O ₂ pelos diferentes substratos do STE	53
Figura 26	O DT2 diminui a atividade da citrato sintase	54
Figura 27	O DT2 diminui a produção de H ₂ O ₂ nos diferentes substratos do STE	55
Figura 28	O DT2 aumenta a concentração de citocinas inflamatórias	56
Figura 29	A combinação da HFD e baixa dose de STZ induz DT2 em ausência de NLRP3, CASP1 e IL1R	58
Figura 30	NLRP3, CASP1 e IL1R não interferem no remodelamento elétrico no DT2	60
Figura 31	A supressão da molécula NLRP3 não melhora a função mecânica nos animais DT2	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição da dieta padrão e dieta hipercalórica (HFD)	19
----------	--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA	Associação americana do diabetes, do inglês <i>American Diabetes Association</i>
AMA	Antimicina A
AMP	Adenosina Monofosfato, do inglês <i>Adenosin Monophosphate</i>
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP, do inglês <i>Adenosin Monophosphate-Activated Protein Kinase</i>
AN	Apertura numérica
ANOVA	Análise de Variância, do inglês <i>Analysis of Variance</i>
APA	Amplitude do potencial de ação, do inglês <i>Action Potential Amplitude</i>
APD	Duração do potencial de ação, do inglês <i>Action Potential Duration</i>
APD30	Duração do potencial de ação ao 30% da repolarização, do inglês <i>Action Potential Duration at 30% of repolarization</i>
APD90	Duração do potencial de ação ao 90% da repolarização, do inglês <i>Action Potential Duration at 90% of repolarization</i>
ASC	Proteína adaptadora contendo domínio CARD, do inglês <i>Adaptor apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área em baixo da curva, do inglês <i>Area Under the Curve</i>
AVC	Acidente vascular cerebral
β -OH-butilato	Beta-hidroxibutilato
BPM	Batimentos por minuto
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
caf	Cafeína
CaMKII	Calmodulina dependente de quinase II
CASP-1	Caspase-1
CCS	Centro de Ciências da Saúde

CENABIO	Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem
CNTRL	Controle
CoA-SH	Coenzima A
CP1	Chappel Perry-1
CP2	Chappel Perry-2
CS	Citrato sintase
D1	Derivação 1 do eletrocardiograma
DC	Doenças cardiovasculares
DG	Diabetes Mellitus Gestacional
DNTB	Ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoico
DM	Diabetes Mellitus
DT1	Diabetes Mellitus tipo 1
DT2	Diabetes Mellitus tipo 2
dob	Dobutamina
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
ELISA	Ensaio por imunoadsorção ligado a enzimas, do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent assay</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FA	Fibrilação atrial
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
FE	Fração de ejeção, do inglês <i>Ejection Fraction</i>
FOV	Campo de visão, do inglês <i>Field Of View</i>
GK	Goto Kakizaki

HOMA	Índice de resistência à insulina, do inglês <i>Homeostatic Model Assessment</i>
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HFD	Dieta hipercalórica, do inglês <i>High Fat Diet</i>
IBCCF	Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
IBqM	Instituto de Bioquímica Médica
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
IDF	Federação Internacional do Diabetes, do inglês <i>International Diabetes Federation</i>
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina 6
IPGTT	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose, do inglês <i>Intraperitoneal Glucose Tolerance Test</i>
IPITT	Teste intraperitoneal de tolerância à insulina, do inglês <i>Intraperitoneal Insulin Tolerance Test</i>
Iss	Corrente de estado estacionário ou sustentado
Ito	Corrente de repolarizante de saída de potássio, do inglês <i>Transient Outward Potassium Current</i>
K-MES	2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid potassium salt
KO	Knock out
MiR05	Tampão de respiração, do inglês <i>Mitochondrial Respiratory Solution 05</i>
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B, do inglês <i>Nuclear Transcription Factor kappa B</i>
OLIGO	Oligomicina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Potencial de ação
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos, do Inglês <i>Pathogen- Associated</i>

Molecular Patterns

PBS	Buffer fosfato salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PLFFM	<i>Pulsed Local-Field Fluorescence Microscopy</i>
PMG	Piruvato-malato-glutamato
PVC	Batimentos ventriculares prematuros, do inglês <i>Premature Ventricular Complex</i>
RCR	Razão do controle respiratório, do inglês <i>Respiratory Control Ratio</i>
RD	Rim direito
RE	Rim esquerdo
RIA	Radio Imuno Ensaio, do inglês <i>Radioimmunoassay</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMP	Potencial de repouso da membrana, do inglês <i>Resting Membrane Potential</i>
ROX	Consumo de oxigênio residual, do inglês <i>Residual Oxygen consumption</i>
S	Succinato
SEM	Erro padrão da média, do inglês <i>Standard Error Mean</i>
STE	Sistema de transporte de elétrons
STZ	Estreptozotocina, do inglês <i>Streptozotocin</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TE	Tempo de Exposição
TEA	Tetraetilamonio
TLR	Receptores de tipo Toll, do inglês <i>Toll like receptors</i>
TNB	Ácido 2-nitro-5-benzoico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TR	Tempo de Repetição
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

VE	Ventrículo esquerdo
VF	Fibrilação ventricular, do inglês <i>Ventricular Fibrillation</i>
VT	Taquicardia ventricular, do inglês <i>Ventricular Tachycardia</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>
WT	Animal selvagem, do inglês <i>Wild Type</i>
YAG	Granate de ítrio e alumínio, do inglês, <i>Yttrium Aluminium Garnet</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Diabetes mellitus	3
1.2. Diabetes mellitus tipo 2	5
1.3. Insulina	6
1.4. Complicações a longo prazo do diabetes	7
1.5. Função mitocondrial e DT2	9
1.6. Sistema imune inato e DT2	10
1.7. Modelos animais de DT2	13
2. HIPOTESE DO TRABALHO	15
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo geral	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. METODOLOGIA	17
4.1. Local da pesquisa	17
4.2. Comitê de ética	17
4.3. Animais	17
4.4. Desenho experimental	18
4.5. Medida da hipertrofia cardíaca	20
4.6. Teste intraperitoneal de tolerância á glicose (IPGTT) e teste intraperitoneal de tolerância à insulina (IPITT)	20
4.7. Medida da resistência a insulina mediante o índice HOMA	21

4.8. Registros de eletrocardiograma	21
4.9. Protocolo de arritmias	22
4.10. Registro de potencial de ação e transitórios de cálcio em coração isolado	23
4.11. Isolamento de cardiomiocitos	27
4.12. Registro de correntes iônicas (Patch clamp)	28
4.12.1. Registro da corrente transitória de saída de potássio	30
4.13. Ressonância magnética nuclear	31
4.14. Dosagem dos níveis de insulina	31
4.15. Dosagem dos níveis de triglicerídeos e colesterol	31
4.16. Dosagem dos níveis de ureia	32
4.17. Detecção de citocinas	32
4.18. Isolamento mitocondrial	32
4.19. Respirometria de alta resolução e medida da produção de H ₂ O ₂ por fluorescência	33
4.20. Atividade da citrato sintase	34
4.21. Análise estatística	35
5. RESULTADOS	36
5.1. Estabelecimento de um modelo animal experimental de DT2 utilizando HFD (45%) e baixa dose de estreptozotocina	36
5.2. Avaliação das alterações elétricas no modelo experimental de DT2	41
5.3. Mecanismos iônicos subjacentes as alterações elétricas observadas	44
5.4. Estudo do potencial arritmogênico	45
5.5. Estudo da atividade elétrica e das propriedades do transiente de cálcio no átrio	47
5.6. Estudo da função ventricular	50

5.7. Estudo do consumo de oxigênio suportado pelos diferentes substratos do sistema de transporte de elétrons (STE), medida da produção de H ₂ O ₂ e quantificação da atividade da citrato sintase	52
5.8. Papel do sistema imune inato no DT2	56
5.9. Avaliação do papel do eixo NLRP3/CASP1/IL-1 β na atividade elétrica no DT2	59
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÕES	69
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	70
9. REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

Tanto o estilo de vida quanto a dieta desempenham um papel muito importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DC), as quais são uma das principais causas de morte no mundo (VAN GAAL; MERTENS; DE BLOCK, 2006).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, em inglês WHO), anualmente morrem mais pessoas por alguma doença cardiovascular que por qualquer outra causa. Estima-se que no ano 2016 morreram 17,5 milhões de pessoas por doenças cardiovasculares, o qual representa 30% dos óbitos registrados no mundo. Desses óbitos, aproximadamente 7,4 milhões foram devidos a doenças coronarianas ou isquêmicas do coração e 6,7 milhões a acidentes vasculares cerebrais (AVC). Dentre os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento destas doenças, encontram-se o sedentarismo, a alimentação inadequada e o tabagismo, que favorecem o desenvolvimento de hipertensão arterial, hiperglicemia, hiperlipidemia e obesidade. Calcula-se que para o ano de 2030, quase 23,6 milhões de pessoas morrerão por alguma doença cardiovascular e estima-se que estas doenças continuem sendo a principal causa de morte no mundo como mostrado na **Fig. 1** (WHO World Health Organization, 2018).

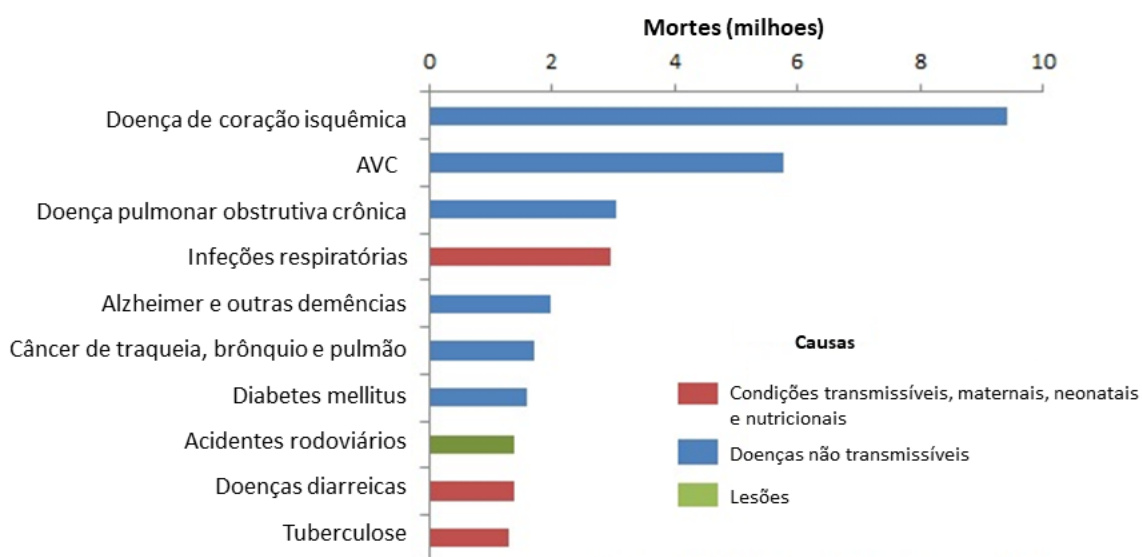


Figura 1: As 10 causas principais de morte no mundo no ano 2016 (Adaptado de World Health Organization, 2018).

Neste sentido, o diabetes mellitus (DM), supõe um elevado custo humano, social e econômico em todos os países e sua incidência e prevalência a nível mundial está em contínuo aumento (IDF Diabetes Atlas 8th edition, 2017). Os pacientes diabéticos apresentam o dobro de incidência de desenvolver doenças cardíacas do que os pacientes não diabéticos (KOVACIC et al., 2014; SZUSZKIEWICZ-GARCIA; DAVIDSON, 2014).

Atualmente, a Federação Internacional de Diabetes (IDF, do inglês *International Diabetes Federation*) estima que aproximadamente 425 milhões de pessoas em todo o mundo são acometidas por diabetes e calcula-se que essa cifra aumentará até 629 milhões para o ano de 2045 (WHO, 2016), sendo a maior prevalência nos países do pacífico ocidental, sudeste asiático, Europa e América do Norte e Caribe como mostrado na Fig. 2.

Já no Brasil, a cifra de pessoas diabéticas chega até 12 milhões de pessoas e, entre 2006 e 2016, o número de brasileiros com diabetes aumentou em 61,8%, isto é, a doença acometeu 8,9% contra 5,5% em 2006. Dito aumento pode ser justificado por fatores como o envelhecimento da população, mudanças dos hábitos alimentares e sedentarismos (DataSUS, 2017).

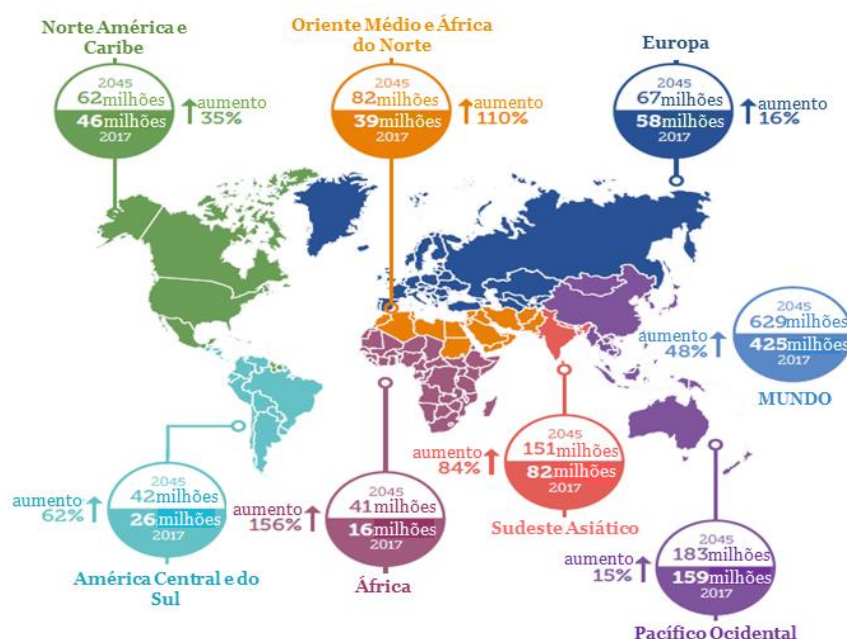


Figura 2: Distribuição mundial da população afetada pelo DM (mapa adaptado da IDF, 8ª edição 2017).

1.1. DIABETES MELLITUS

A primeira referência sobre o diabetes, encontra-se no papiro descoberto por Ebers em 1867 no Egito. No papiro, datado de 1500 antes do Cristo (**Fig. 3**), são descritos alguns sintomas que parecem corresponder ao que hoje conhecemos como diabetes. Este documento descreve uma doença caracterizada por poliúria e recomenda o uso de extratos de plantas para o seu tratamento (KING; RUBIN, 2003).

Foi Areteu da Capadócia quem, no século II da era Cristã, deu a esta afeição o nome de diabetes, que no grego significa sifão, devido a característica mais notória de eliminação excessiva de água pelos rins (KARAMANOU, 2016).

O termo “mellitus” (sabor de mel) foi dado em 1679 pelo médico inglês Thomas Willis, se referendo ao sabor doce da urina. Mas Willis não conseguiu explicar a razão desse sabor doce. A explicação para esse fato foi dada 100 anos mais tarde pelo fisiologista Mathew Dobson, quem demonstrou experimentalmente a presença de açúcar na urina (LAKHTAKIA, 2013; LBOVITZ, 1984).

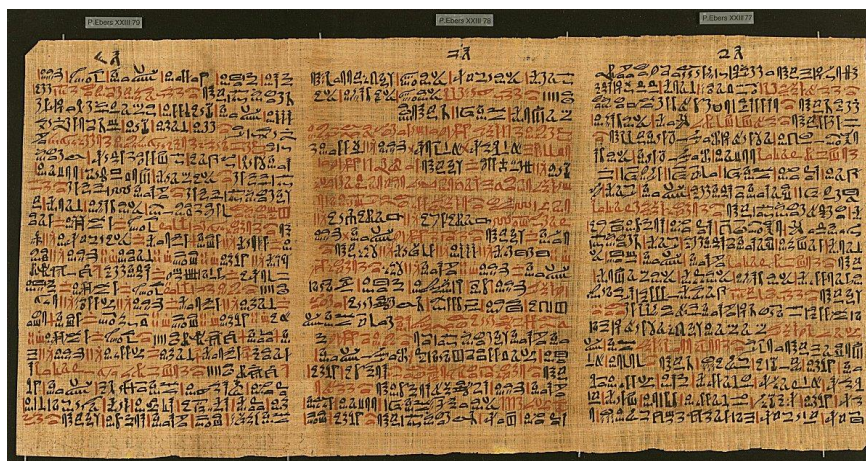


Figura 3: Papiro de Ebers. Primeiro manuscrito onde são descritos os sintomas do diabetes mellitus.

Os trabalhos clínicos de Friedrich Theodor von Frerichs, Arnoldo Cantani, Bernhard Naunyn e Étienne Lanceraux entre outros, adquiriram grande importância ao final do século XIX. Mas a descoberta mais importante foi dada pelo médico canadense Frederick Banting e o aluno dele Charles Herbert Best, os quais em 1921 conseguiram isolar a insulina e mostrar o seu efeito hipoglicemiante (SCHADEWALDT, 1989).

O diabetes é definido como uma síndrome caracterizada por hiperglicemia crônica e alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, associadas com uma deficiência total ou parcial da secreção ou atividade da insulina (BENNETT, 1994). Esses níveis elevados de glicose no sangue podem produzir danos a longo prazo em vários órgãos principalmente rins, olhos, coração e sistema nervoso, que implicam em complicações tais como doenças cardiovasculares, neuropatia, nefropatia ou doenças oculares que terminam em retinopatia e cegueira (ALAM et al., 2014).

Existem, de acordo com as características clínicas e fisiopatológicas, diferentes tipos de diabetes. Os três tipos de diabetes mais frequentes são: Diabetes Mellitus tipo 1 ou insulino dependente (DT1), Diabetes Mellitus tipo 2 ou insulino resistente (DT2) e Diabetes Mellitus Gestacional (DG) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

O DT1 é caracterizado pela destruição, principalmente por um processo autoimune, das células beta pancreáticas produtoras de insulina, resultando numa deficiência absoluta de insulina e como consequência, a concentração de glicose no sangue destes pacientes é muito elevada. Este tipo de diabetes apresenta-se geralmente em idades precoces, sendo também chamado de diabetes juvenil, embora possa aparecer em qualquer idade (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011). Já o DT2 ocorre habitualmente em idades tardias e resulta de um defeito progressivo da secreção de insulina acompanhado de resistência à insulina (GRUNDY et al., 1999). Finalmente, existem mulheres que durante a gravidez desenvolvem uma resistência à insulina acompanhada de um aumento na concentração de glicose no sangue. Esse tipo de diabetes é denominado diabetes gestacional (DG) e aparece entre a 24ª e a 28ª semana de gravidez. Sua fisiopatologia é explicada pela elevação de hormônios contrarreguladores da insulina (IDF Diabetes Atlas 1st edition, 2000).

Dentre os tipos de diabetes, o DT2 é o de maior incidência e prevalência na população, sendo que cerca de 90% dos pacientes diabéticos no mundo apresentam DT2, podendo desenvolver doenças cardiovasculares (hipertensão, doença coronária, AVC) o que aumenta o risco de morte nessa população (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001). Nesta tese, vamos nos focar neste tipo de diabetes.

1.2. DIABETES MELLITUS TIPO 2

O diabetes mellitus tipo 2 é a forma mais frequente de diabetes, na qual a hiperglicemia é o resultado da associação de uma produção inadequada de insulina e da incapacidade do organismo de responder plenamente a dito hormônio, o qual é conhecido como resistência à insulina (OLOKOBA; OBATERU; OLOKOBA, 2012).

A história do DT2 começa no ano 1930, quando o clínico britânico Harry Himsworth observou numa série de experimentos que a utilização do açúcar pelo organismo não só depende da quantidade de insulina presente mas também em quão sensível o corpo é aos efeitos da insulina, mostrando assim que existem dois tipos de diabetes: diabetes tipo 1 e diabetes tipo 2 (BRYDER; HARPER, 2013). Porém, nos anos 50 a teoria de Himsworth de que o DT2 envolve sensibilidade reduzida à insulina não era muito bem aceita na comunidade médica. Assim, em 1960 Rosalyn Yalow e Solomon Berson utilizando a técnica do radioimunoensaio (RIA, do inglês *Radioimmunoassay*), mostraram que no DT2, ao invés de produzir menos insulina após administração de açúcar, os pacientes com DT2 geravam mais insulina que aqueles pacientes não-diabéticos (GOLDSMITH, 2012).

Outros pesquisadores mostraram que, embora as pessoas em etapas iniciais do DT2 produzem mais insulina do que o normal, com o passar do tempo, seus níveis de insulina decaem e, eventualmente, esses níveis ficam abaixo do que é observado em indivíduos normais, gerando um quadro clínico de diabetes severo (AHMED, 2002). O resultado dessa descoberta foi a hipótese de que para compensar a falta de sensibilidade à insulina (resistência à insulina), os pacientes com DT2 inicialmente produzem um excesso desse hormônio, permitindo-os converter eficientemente o açúcar da dieta em energia para os tecidos. Porém, com o tempo, as células pancreáticas produtoras de insulina se deterioram, sendo incapazes de produzir a insulina suficiente fazendo que os pacientes precisem de tratamento com reposição de insulina, principalmente nos estádios finais da doença (JOSELYN ROJAS, 2013).

O DT2 aparece geralmente em idades adultas, porém, é cada vez mais frequente seu diagnóstico em crianças e jovens adultos, devido a uma dieta inadequada, falta de atividade física e antecedentes de DG (TIEH; DREIMANE, 2014). Como comentado acima, a resistência à insulina é uma característica clássica desta doença.

1.3. INSULINA

O DT2 é caracterizado por uma: (i) resistência à insulina, (ii) produção deficiente de insulina e (iii) falha nas células beta pancreáticas. Isso acarreta uma diminuição no transporte de glicose para músculo, tecido adiposo e células hepáticas onde pode ser utilizada como energia, resultando num aumento de glicose no sangue (hiperglicemia) (MA; WANG; LI, 2015).

A insulina é um hormônio secretado pelas células beta pancreáticas em resposta a vários estímulos sendo a glicose o mais relevante. A insulina é uma pequena molécula composta por 51 aminoácidos (**Fig. 4**), organizados em uma cadeia A de 21 peptídeos e outra cadeia B de 30 peptídeos unidas por duas pontes bissulfeto e com um peso molecular de 5808 Da (NICOL; SMITH, 1960).

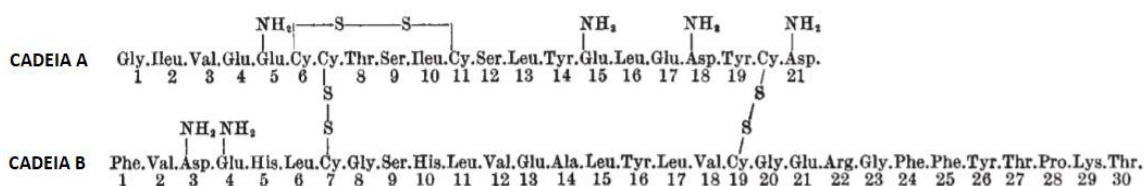


Figura 4: Sequência de aminoácidos de insulina humana (Adaptado de Nicol & Smith, Nature 1960).

A insulina está envolvida em vários processos celulares, além do metabolismo de nutrientes, que inclui a síntese de proteínas, biogênese mitocondrial, crescimento, autofagia, proliferação, diferenciação e migração (WHITE, 2003). Suas ações biológicas começam quando ela se liga ao seu receptor, uma glicoproteína de membrana formada por duas subunidades alfa (α) e duas subunidades beta (β). A subunidade α de 135 kDa contém o sítio de ligação para a insulina, é totalmente extracelular e se liga à região extracelular da subunidade β assim como com a outra subunidade α , através de pontes bissulfeto. A subunidade β , de 95 kDa, compõe-se de um domínio extracelular, um

domínio transmembrana e outro intracelular. A união da insulina com seu receptor gera mudanças conformacionais que induzem sua ativação catalítica (BUNNER; CHANDRASEKERA; BARNARD, 2014).

Estudos clínicos e experimentais vêm mostrando que a resistência à insulina nos tecidos metabólicos como o tecido adiposo, hepático e muscular, constitui um traço característico da disfunção metabólica. Essa resistência à insulina contribui para o desenvolvimento de outras condições como dislipidemia, hipertensão e aterosclerose (KAHN; FLIER, 2000).

1.4. COMPLICAÇÕES A LONGO PRAZO DO DIABETES

Nos últimos anos, avançou-se muito no tratamento do diabetes melhorando a expectativa de vida destes pacientes. Porém, ao aumentar dita expectativa de vida, apareceram complicações a longo prazo como hipertensão, retinopatia diabética, neuropatia diabética, microangiopatia, insuficiência renal ou cardiopatia diabética. Esta última produz tanto alterações mecânicas quanto elétricas, sendo responsável por 65% dos óbitos que ocorrem na população diabética (CASIS; ECHEVARRIA, 2004; OKOSHI K.; DI MUZIO B.P.; OKOSHI M.P., 2007).

A cardiopatia diabética é uma condição clínica diagnosticada quando os pacientes diabéticos desenvolvem uma disfunção ventricular na ausência de aterosclerose coronariana e hipertensão comprometendo tanto a capacidade contrátil do cardiomiócito, quanto a inervação, dada pelo sistema autônomo, do coração (GALLEGO M. & CASIS O., 2014). Os mecanismos subjacentes que acarretam o desenvolvimento da cardiopatia diabética ainda não são completamente elucidados, porém parecem estar associados ao dano celular produzido pela hiperglicemia. Os estágios iniciais da cardiopatia diabética se associam com uma redução da disfunção diastólica e insuficiência cardíaca (WARD; CROSSMAN, 2014).

A cardiopatia diabética produz alterações elétricas, as quais são observadas no eletrocardiograma (ECG) dos pacientes diabéticos. Assim, as principais alterações observadas no ECG desses pacientes (quando comparados com pacientes não diabéticos

do mesmo sexo e idade), são um prolongamento do intervalo QT corrigido (QTc) e um aumento da dispersão desse intervalo QT (QTd) (VEGLIO et al., 2002). Ambas as alterações estão associadas a um maior risco de gerar arritmias cardíacas, o que explica a maior incidência de arritmias ventriculares e de morte súbita que já foi demonstrada em pacientes diabéticos. Essas alterações no ECG refletem o aumento da duração do potencial de ação (PA) que pode ser explicada tanto por uma redução das correntes iônicas envolvidas na repolarização ventricular cardíaca como por um aumento de correntes despolarizantes (LENGYEL et al., 2007; ROBILLON et al., 1999). Essa elevada incidência torna indispensável conhecer os mecanismos responsáveis pela geração destas arritmias.

Casis e colaboradores (CASIS et al., 2000), empregando um modelo animal de DT1 induzida por estreptozotocina (STZ, do inglês *Streptozotocin*), mostraram que existe uma variabilidade regional na duração do PA cardíaco e que nos cardiomiócitos de animais diabéticos o prolongamento do PA é maior tanto no endocárdio quanto no endocárdio do ventrículo esquerdo e também no ventrículo direito. O prolongamento, observado pelos autores na duração do PA (**Fig. 5**), pode ser explicado por uma alteração na densidade da corrente transitória de saída de potássio (I_{to}) envolvida no PA.

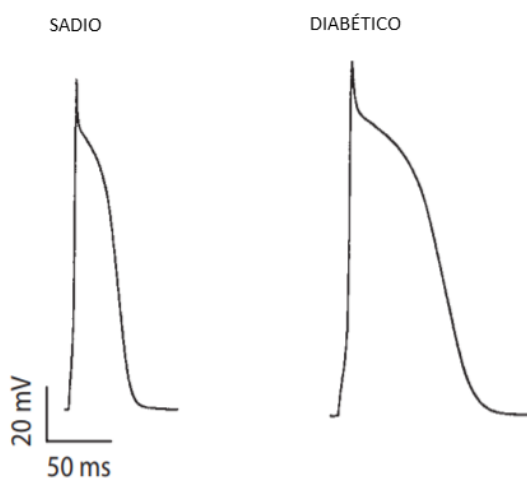


Figura 5: Representação de um registro de potencial de ação cardíaco do ventrículo esquerdo sadio vs diabético, no qual observa-se que está prolongado nos pacientes diabéticos quando comparados com pacientes não diabéticos (sadios) (Adaptado de Casis et al., 2000).

Para o estudo do remodelamento elétrico cardíaco, tem sido utilizado animais de laboratório como ratos, camundongos e coelhos, nos quais foi induzido um diabetes do tipo 1 utilizando substâncias tóxicas às células beta pancreáticas, como o aloxano ou a STZ. Nesses estudos, tem sido demonstrado que os modelos animais reproduzem o remodelamento elétrico cardíaco presente nos pacientes com diabetes tanto do tipo 1 como do tipo 2 (REES; ALCOLADO, 2005).

Existem duas hipóteses para explicar as mudanças produzidas pela diabetes nas correntes de K^+ cardíacas. A primeira atribui essas mudanças diretamente ao déficit de insulina, já que este hormônio interfere na expressão de uma grande quantidade de proteínas, incluindo os canais iônicos (O'BRIEN; GRANNER, 1996). Já a segunda hipótese postula que a alteração no comportamento das correntes de K^+ deve-se ao metabolismo defeituoso da glicose (XU et al., 2002).

Foi demonstrado que a causa da redução na expressão das proteínas formadoras de canais de K^+ no diabetes é a ativação da quinase dependente de AMP (AMPK) como consequência da deterioração do estado metabólico das células cardíacas. Já as alterações de suas propriedades biofísicas são justificadas pelas alterações na regulação dos canais pela quinase dependente de cálcio e calmodulina II (CaMKII), a qual, neste caso, é secundária ao déficit de insulina (GALLEGO et al., 2008; TORRES-JACOME et al., 2013).

Além das alterações eletrofisiológicas descritas nesta doença, também já foram muito bem documentadas as alterações na estrutura/função mitocondrial.

1.5. FUNÇÃO MITOCONDRIAL E DT2

Todos os organismos vivos apresentam mecanismos celulares e fisiológicos de homeostasia a fim de manter o ambiente interno em ótimas condições para o correto funcionamento. As mitocôndrias são a base da homeostase celular, através das múltiplas funções na produção de energia, biossíntese, regulação e sinalização do cálcio, balanço redox e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (HERST et al., 2017).

As células apresentam múltiplos mecanismos para garantir o correto funcionamento mitocondrial como importação, dobramento e degradação proteica, mecanismos de defesa antioxidantes, biogênese mitocondrial, recambio mitocondrial via autofagia ou mudanças na morfologia mitocondrial e remodelamento das cristas mitocondriais (JENSEN; JASPER, 2014; PERNAS; SCORRANO, 2016; WIEDEMANN; PFANNER, 2017).

Existem evidências indicando que a disfunção mitocondrial pode ter um papel muito importante na patogênese celular e molecular de diversas doenças incluindo envelhecimento, doenças neurodegenerativas como Alzheimer ou Parkinson, doenças cardiovasculares, câncer, ou DT2 (OTERA; MIHARA, 2011; RANIERI et al., 2013).

Como já foi descrito anteriormente, as complicações metabólicas do DT2 incluem hiperglicemia, resistência à insulina e alterações na secreção da insulina pelas células β pancreáticas (OLOKOBA; OBATERU; OLOKOBA, 2012). E uma das principais causas de tais alterações metabólicas é o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs, do inglês ROS, *Reactive Oxygen Species*) devido à hiperglicemia (MANDÒ et al., 2018). Esse aumento de EROs induz deterioração das células β pancreáticas incrementando a resistência à insulina (KANETO et al., 2010).

Até o presente momento não está claro qual a é o mecanismo da fisiopatologia destas alterações tanto na estrutura/função da mitocôndria como das alterações eletrofisiológicas descritas no DT2, entretanto na última década, principalmente, os estudos acima do sistema imune principalmente da resposta imune inata tem revelado novos mecanismos fisiopatológicos nesta doença.

1.6. SISTEMA IMUNE INATO E DT2

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra organismos invasores e consiste em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos, que já existem até mesmo antes da infecção e que estão prontos para responder rapidamente a infecções. Esses mecanismos reagem aos micro-organismos e aos produtos das células lesionadas e respondem essencialmente da mesma maneira a infecções repetidas (ABBAS;

LICHTMAN; PILLAI, 2012). Ele é composto por um grupo de proteínas e células fagocíticas que reconhecem características conservadas de patógenos e é ativado pela presença de antígenos e as características químicas dos mesmos para eliminar os invasores (ALBERTS; JOHNSON; LEWIS, 2002).

Diferentes tipos celulares e estruturas vinculadas a produção e liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas, estão envolvidas na resposta imune inata. Um dos principais protagonistas são os receptores do tipo “Toll” (TLR, do inglês *Toll Like Receptors*) que são uma família de receptores principalmente de membrana, ativados por moléculas liberadas durante a lesão. Alguns desses receptores estão associados a endossomos, presentes tanto nas células do sistema imune inato como em células de diversos órgãos, incluindo o coração. Estudos recentes mostraram a correlação entre alterações na expressão destes receptores e patologias cardíacas (ADAMCZAK, 2017; VALLEJO, 2011).

No DT1, o sistema imunológico inato tem um papel muito importante já que esta doença se apresenta como um estado inflamatório agudo caracterizado pela ativação de vias de sinalização de resposta inflamatória, dentre elas os TLRs (como mostrado na **Fig. 6**), NF-kB e inflamossoma com conseqüente aumento na secreção de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β dentre outras (DEVARAJ; TOBIAS; JIALAL, 2011). Os inflamossomas são complexos intracelulares multiproteicos compostos por uma molécula sensor, uma proteína adaptadora denominada ASC contendo domínio CARD (do inglês, *adaptor apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) de recrutamento de caspase, e uma procaspase-1 (CASP1). A principal função dos inflamossomas consiste na maturação dos precursores pro-IL-1 β e pro-IL18, gerando as respectivas citocinas maduras prontas para serem secretadas (MANGAN et al., 2018).

Embora o DT2 é tradicionalmente considerado como um distúrbio metabólico, atualmente é reconhecido como uma doença crônica de baixo grau inflamatório caracterizado por um incremento de citocinas inflamatórias circulantes que contribuem para disfunção metabólica (CANCELLO; CLÉMENT, 2006; FEUERER et al., 2009). Os pacientes com DT2 apresentam ativação crônica do sistema imune inato nas ilhotas

pancreático e em tecidos sensíveis a insulina como tecido adiposo, músculo esquelético e tecido hepático (HERDER et al., 2015).

Assim, a inflamação é a causa subjacente do DT2 e as vias inflamatórias contribuem para alteração do manejo da glicose pelos adipócitos, hepatócitos e células do músculo esquelético interferindo na produção e sinalização da insulina (KOHLGRUBER; LYNCH, 2015).

Já tem sido descrito que no DT2 existe um aumento na produção de IL-1 β que leva a uma secreção deficiente de insulina, diminuição da proliferação celular e apoptose das células β (HERDER et al., 2015; PARK et al., 2017; PATEL et al., 2016; SPRANGER et al., 2003). Neste contexto, o IL-1 β tem um papel muito importante na resistência à insulina e elevados níveis de IL-1 β , IL-6 e proteínas circulantes no DT2 podem refletir a ativação do sistema imune inato (LAGATHU et al., 2006).

Nos últimos anos, o papel do sistema imune inato adquiriu grande relevância na fisiopatologia de diversas doenças cardiovasculares tornando indispensável estudar sua função em doenças que implicam alterações cardiovasculares, como o diabetes.

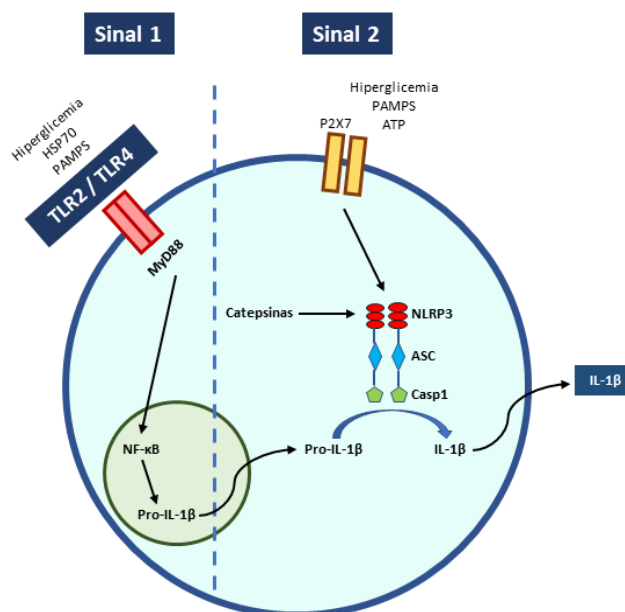


Figura 6: Representação da ativação do inflamossoma NLRP3 pela via do TLR (Adaptado de Dowling & O'Neil, 2012).

Embora cerca de 90% dos pacientes diabéticos apresentem DT2, a maioria dos trabalhos experimentais em eletrofisiologia foram realizados em modelos animais de DT1. Esse fato é devido a carência de um bom modelo animal que reproduza o mais fidedignamente possível o DT2 do paciente humano.

1.7. MODELOS ANIMAIS DE DT2

Existem vários modelos animais de DT2, os quais podem ser classificados em função do seu mecanismo de produção como: (i) espontâneos ou (ii) induzidos. Além disso, em cada uma dessas categorias podemos distinguir dois modelos: análogos e intrínsecos. Os modelos análogos são úteis como substitutos da doença humana e permitem, até certo ponto, torná-los acessíveis para experimentação. Os modelos intrínsecos, por outro lado, não tratam de imitar a doença humana, mas servem para responder algumas perguntas concretas da própria doença (KING, 2012).

Os modelos espontâneos são estirpes que são mantidas relativamente inalteradas através de cruzamentos endogâmicos, que podem vir de animais nos quais têm sido detectado o diabetes espontaneamente ou de animais procedentes de uma série de cruzamentos seletivos que favorecem um determinado traço fenotípico da DT2 humana. Assim, como exemplo destes modelos temos: o rato Goto Kakizaki (GK), o rato Olef, o rato Zucker, o camundongo db/db ou o camundongo ob/ob (CHATZIGEORGIOU et al., 2009).

Já nos modelos induzidos, existem vários modelos submetidos a indução por hormônios, administração de fármacos ou administração de determinados nutrientes que permitem, principalmente, estudar a fisiologia e os mecanismos patogênicos que interferem no DT2 e suas complicações tardias. Porém, esses modelos só conseguem imitar algumas das manifestações clínicas do DT2 como a hiperglicemia ou a resistência à insulina (LUO et al., 1998).

Recentemente, foi desenvolvido um modelo animal de DT2 que reproduz a história natural e as características do DT2 do paciente humano, especialmente a glicemia elevada, porém não tanto quanto na DT1, hiperlipidemia e principalmente a

resistência à insulina. Esse modelo combina a alimentação baseada numa dieta hipercalórica junto a uma baixa dose de um fármaco citotóxico das células beta pancreáticas chamado estreptozotocina (STZ) (ALBERSEN et al., 2011; REED et al., 2000; SRINIVASAN et al., 2005; TI et al., 2011) e é esse o modelo utilizado neste projeto.

2. HIPOTESE DO TRABALHO

O modelo experimental de diabetes tipo 2 que combina uma dieta hipercalórica (HFD) e uma baixa dose de estreptozotocina (STZ), reproduz o remodelamento elétrico, mecânico e metabólico cardíaco classicamente descrito nesta síndrome em humanos associada a um aumento da produção de IL-1 β .

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar os mecanismos envolvidos no remodelamento elétrico, mecânico e metabólico cardíaco no DT2 em um modelo animal experimental.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Reproduzir o modelo animal experimental de DT2 utilizando HFD (45%) e baixa dose de Estreptozotocina (STZ);

- ✓ Testar a sub-hipótese que o modelo de DT2 utilizado promove remodelamento elétrico cardíaco:
 - (i) prolongando a duração do intervalo QJ,
 - (ii) prolongando a duração do potencial de ação ventricular,
 - (iii) diminuindo a corrente Ito na parede ventricular,
 - (iv) aumentando a suscetibilidade a desenvolver arritmias cardíacas,
 - (v) diminuindo a duração do potencial de ação atrial,
 - (vi) aumentando a incidência de alterações no ritmo elétrico atrial;

- ✓ Testar a sub-hipótese que o modelo de DT2 promove alterações ventriculares mecânicas;

- ✓ Testar a sub-hipótese que a função metabólica neste modelo está deteriorada, estudando a estrutura/função mitocondrial;

- ✓ Testar a sub-hipótese que as alterações cardíacas no modelo de DT2 estão associadas a um aumento da expressão/função do eixo NLRP3/CASP1/ IL-1 β .

4. METODOLOGÍA

4.1. LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Cardioimunologia sob orientação do professor Emiliano Medei, e no Laboratório de Eletrofisiología Cardíaca Antônio Paes de Carvalho no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil. A ressonância magnética nuclear (RMN) foi realizada no Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO/UFRJ) e os experimentos de respiração mitocondrial e medida da atividade das enzimas relacionadas aos sistemas antioxidantes foram realizados no Laboratório de Bioenergética e Fisiologia Mitocondrial do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis (IBqM).

4.2. COMITÊ DE ÉTICA

O trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas de Boas Práticas de Uso em Experimentação Animal, tendo o pesquisador recebido um treinamento prévio. O projeto foi realizado mediante aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais da UFRJ sob o número de protocolo DFBCICB041. Os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram aceitos pelo Comitê para o Uso de Animais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, protocolos número: 130/13, 131/13, 102/15 e 137/16.

4.3. ANIMAIS

Neste projeto foram utilizados camundongos C57BL/6 machos adultos (2 meses de idade), os quais foram mantidos no biotério do IBCCF em condições controladas de temperatura constante (23°C) e períodos de luz/escuridão num ciclo padrão de 12h/12h e acesso a água e comida *ad libitum*. Também foram utilizados camundongos *knockout* (KO) gerados a partir da cepa C57BL/6 mantidos no biotério do CENABIO nas mesmas condições. A eutanásia foi induzida utilizando excesso de isoflurano e por deslocamento cervical.

4.4. DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram separados em 4 grupos experimentais como descrito na **Fig. 7**: WT CNTRL (grupo controle), WT HFD (grupo com adição de dieta hipercalórica), WT STZ (grupo com injeção de STZ) e WT DT2 (grupo com dieta hipercalórica e injeção de STZ). Tanto os animais do grupo HFD quanto os animais do grupo DT2, foram alimentados com uma ração hipercalórica ou *high fat diet* (HFD) (PRAGSOLUÇÕES Biociências) que contem 45% das calorias procedentes de gorduras, 35% das calorias procedentes de carboidratos e 20% das calorias procedentes de proteínas. Da mesma forma, os animais do grupo CNTRL e os animais do grupo STZ foram alimentados com uma dieta padrão (Nuvilab) (**tabela 1**).

Após duas (2) semanas do estabelecimento da dieta, os animais do grupo STZ e os animais do grupo DT2 receberam 2 injeções intraperitoneais de estreptozotocina (STZ) de 40 mg/kg de animal separadas 24 h uma da outra para produzir uma destruição parcial das células beta pancreáticas. Em contrapartida, os animais do CNTRL e HFD receberam um veículo (tampão citrato pH 4,5).

Para aferir a glicemia plasmática, foi utilizado um glicômetro (Contour™ TS Bayer) e tiras de teste para glicose sanguínea (Bayer). Os animais com uma glicemia superior a 140 mg/dL após 6 horas de jejum, foram considerados como diabéticos tipo 2 e foram utilizados para o estudo. A eficiência do método de indução foi de aproximadamente 90%.

Quatro semanas após a injeção de STZ, foram feitas as análises dos parâmetros biométricos, funcionais, bioquímicos e moleculares. Ambas dietas foram mantidas ao longo de todo o procedimento.

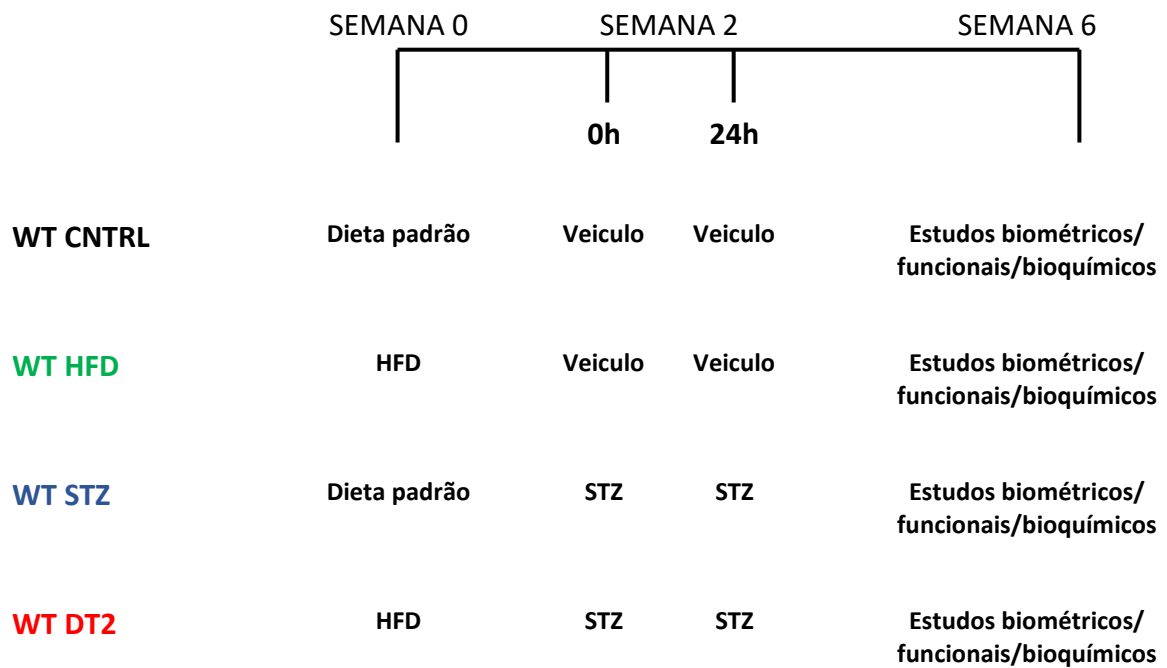


Figura 7: Desenho experimental. CNTRL: Controle, HFD: High Fat Diet, STZ: Streptozotocin e DT2: Diabetes tipo 2.

	DIETA PADRÃO	HFD
LIPÍDIOS (kcal%)	12	45
CARBOIDRATOS (kcal%)	67	35
PROTEÍNAS (kcal%)	21	20
Kcal/g	3,33	4,73

Tabela 1: Composição da dieta normal e dieta hipercalórica (HFD).

4.5. MEDIDA DA HIPERTROFIA CARDÍACA

Com o intuito de avaliar a possível hipertrofia cardíaca nos animais de estudo, os corações foram pesados e normalizados pelo peso corporal e pelo comprimento da tíbia. Calculou-se então, a relação peso coração/peso corporal e peso coração/comprimento da tíbia (SCHAIBLE & SCHEUER, 1979; YIN et al., 1982).

Para isso, os animais foram pesados e eutanasiados por deslocamento cervical, o coração foi extraído, lavado com solução salina (tampão fosfato salino, PBS), secado para tirar o excesso de líquido e pesado numa balança analítica de precisão. O comprimento da tíbia foi medido com um paquímetro.

4.6. TESTE INTRAPERITONEAL DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (IPGTT) E TESTE INTRAPERITONEAL DE TOLERÂNCIA A INSULINA (IPITT)

O diabetes tipo 2 é caracterizado por hiperglicemia, resistência à insulina e deficiência relativa de insulina (WESTMAN et al., 2018). Portanto, para estudar se os animais são resistentes a este hormônio foram realizados os testes intraperitoneais de tolerância à glicose (IPGTT, do inglês *Intraperitoneal Glucose Tolerance Test*) e à insulina (IPITT, do inglês *Intraperitoneal Insulin Tolerance Test*).

Para o IPGTT, os animais foram mantidos em jejum por 6 horas. Posteriormente, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de 2 g/kg animal de glicose, aferindo a glicemia antes e após 15, 30, 60 e 120 minutos da injeção. Com esse ensaio é possível avaliar a captação de glicose, sem justificar, no entanto, se essa alteração na captação de glicose é devida a uma insuficiência na produção de insulina ou insulina ineficiente. Por isso, realizamos o segundo teste, o IPITT, no qual aplicamos uma dose de insulina que suprime o fato de não produzir insulina suficiente. Para o IPITT, os animais foram mantidos em jejum por 4 horas e após esse tempo, injetados 0,5 U/kg animal de insulina, para aferição de glicose antes e após 15, 30, 60 e 120 minutos da injeção.

4.7. MEDIDA DA RESISTÊNCIA À INSULINA MEDIANTE O ÍNDICE HOMA

A resistência à insulina pode ser aferida mediante testes de tolerância a glicose ou insulina e também, mediante o índice HOMA.

O índice HOMA (do inglês, *Homeostatic Model Assessment*) é um método bem simples que avalia a resistência à insulina utilizando os parâmetros de glicose e insulina em jejum. O índice HOMA calcula-se mediante a seguinte fórmula: (glicose em jejum x insulina em jejum) / 22,5 (VAN DIJK et al., 2013).

4.8. REGISTROS DE ELETROCARDIOGRAMA

A técnica padrão para estudar a atividade elétrica do coração é o eletrocardiograma (ECG) e consiste numa técnica utilizada comumente no diagnóstico do estado do coração. Através desta técnica podem ser diagnosticadas patologias tais como aquelas que apresentam uma morfologia de ECG única relacionada com doenças específicas como o síndrome do QT longo ou síndrome de Brugada (BRUGADA; BRUGADA, 1992; MOSS et al., 1991).

Assim, para obter os registros de eletrocardiograma (ECG), foram implantados nos animais dois eletrodos subcutâneos sob anestesia com isoflurano nas patas dianteiras direita e esquerda correspondendo à derivação 1 (D1) do ECG obtendo um registro como no mostrado na **Fig. 8**. Os ECG foram registrados em camundongos acordados após um tempo mínimo de 24 horas do implante dos os eletrodos para evitar a possível influência do anestésico nos registros.

No momento do registro, os conectores foram ligados por cabos flexíveis a um amplificador diferencial (fabricado pelo professor Ariel Escobar, da Universidade da Califórnia, Merced), utilizando um filtro passa-baixa de 500 Hz e uma frequência de aquisição de 1 kHz. O sinal foi digitalizado utilizando o Digidata 1440A (Minidigi 1-D, Axon Instruments, EUA) e registrada utilizando um programa de aquisição baseado no software LabVIEW (National Instruments, EUA). Foram analisadas as durações dos seguintes parâmetros: intervalo RR e intervalo QJ.

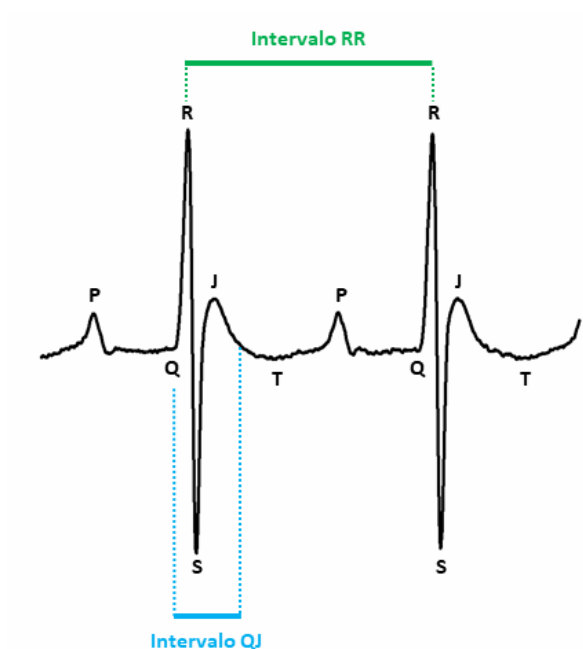


Figura 8: Registro de eletrocardiograma em camundongo C57bl/6 controle na derivação I com os parâmetros registrados.

4.9. PROTOCOLO DE ARRITMIAS

Para estudar a vulnerabilidades dos animais diabéticos para desenvolver arritmias cardíacas, realizamos um protocolo de arritmias que combina uma dose intraperitoneal (i.p.) de cafeína (120 mg/kg) e uma dose intravenosa (i.v.) de dobutamina (50 µg/kg), tal como foi descrito por Erikson e colaboradores (ERICKSON et al., 2013).

Para realizar o teste, os animais foram anestesiados com uma injeção i.p. de xilazina (0,5 mg/g) e ketamina (1,5 mg/g) (Syntec, Brasil). Uma vez anestesiados, foi realizado um registro de ECG durante 3 minutos para ter a condição pré-injeção. Após esse tempo, foi aplicada a dose de caf/dob e foi registrado imediatamente o ECG durante 15 minutos.

Os eventos arrítmicos gerados durante esse intervalo foram identificados e quantificados em função da gravidade dos mesmos tal como descrito por Curtis e Walter e Erickson e colaboradores (CURTIS; WALKER, 1988; ERICKSON et al., 2013). De cada registro apenas foi tomado em consideração o evento de maior severidade. Assim, os

eventos foram pontuados em função do seguinte *score*: 0: ausência de eventos; 1: batimentos ventriculares prematuros ou extra-sístoles (PVC, do inglês *Premature Ventricular Complex*); 2: bigeminismo; 3: taquicardia ventricular (VT, do inglês *Ventricular Tachycardia*) e 4: fibrilação ventricular (VF, do inglês *Ventricular Fibrillation*).

Os registros foram analisados com o programa Clampfit 10.7 (Axon Instruments).

4.10. REGISTROS DE POTENCIAL DE AÇÃO E TRANSIENTES DE CALCIO DE CORAÇÃO ISOLADO

Sabe-se que o ECG representa o somatório dos potenciais de ação (PA) dos miócitos cardíacos, sendo que as alterações observadas no ECG são devidas a alterações no potencial de ação cardíaco. A nível celular, a atividade elétrica do coração é medida através do potencial de ação (PA).

O PA é o sinal produzido pela mudança na voltagem da membrana da célula cardíaca durante um período de tempo. Essa mudança na voltagem se produz como resultado do movimento de íons (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) através da membrana plasmática da célula (NERBONNE; KASS, 2005).

O aumento e queda do Ca^{2+} citosólico é essencial para definir a função do órgão como uma bomba eletromecânica (RINGER, 1883). Esse aumento e queda do Ca^{2+} é referido como transiente de Ca^{2+} . Os níveis de Ca^{2+} são importantes na regulação da pressão, contractilidade e duração do potencial de ação (APD, do inglês *Action Potential Duration*).

O aumento do Ca^{2+} citosólico é devido principalmente à liberação do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. Esse Ca^{2+} liga-se à Troponina C e inicia a maquinaria contráctil. A receptação, assim como a liberação do Ca^{2+} também é altamente regulado (BERS, 2002).

Avaliar a cinética dos transientes de Ca^{2+} é essencial para entender as alterações nos mecanismos de excitação-contração e da liberação do Ca^{2+} induzido por Ca^{2+} , que em última instancia afeta a função do coração.

Para realizar os registros de PA cardíaco e dos transitórios de cálcio de coração intacto, foi utilizado um sistema de perfusão retrógrada de Langendorff que permite manter o coração funcional *ex vivo* durante horas como descrito previamente por Mejía-Alvarez e colaboradores (MEJÍA-ALVAREZ et al., 2003) (**Fig. 9**).

Com o intuito de evitar o dano tissular pela formação de coágulos sanguíneos, os animais foram injetados com heparina sódica (i.p.) e eutanasiados por deslocamento cervical 15 minutos após a injeção da heparina sódica. O coração foi rapidamente extraído e canulado pela aorta numa agulha de canulação 23G, amarrado com linha de sutura e perfundido continuamente com uma solução Tyrode oxigenada contendo (em mM): NaCl 140; KCl 5,4; CaCl_2 2; MgCl_2 1; NaPO_4H_2 0,33; HEPES 10 e glicose 10. Para simular o pH plasmático de 7,4, o pH foi calibrado com NaOH a 32°C. O excesso de solução foi retirado da câmara mediante um sistema de sucção por vácuo.

Uma vez canulado o coração, deixou-se estabilizar por 5 minutos a temperatura ambiente, com a solução Tyrode. Em seguida, o coração foi perfundido durante 30 minutos com solução Tyrode contendo o indicador fluorescente sensível ao cálcio, Rhod-2 AM (Abcam) que permite monitorar o Ca^{2+} intracelular. O Rhod-2AM (50 μg) foi preparado com 20 μl de Pluronic 20% em 2ml de Tyrode a temperatura ambiente como previamente descrito por Aguilar-Sanchez e colaboradores (AGUILAR-SANCHEZ et al., 2017). Após esse tempo, parou-se a perfusão com Rhod-2AM e os corações foram perfundidos de novo com solução Tyrode.

Posteriormente, ligou-se a fonte de energia conectada a uma placa termoeletrica Peltier (TEC1-12706), a qual aqueceu a solução da câmara.

A contração mecânica do coração dificulta o registro dos PA, por isso, antes e durante a realização dos registros, os corações foram perfundidos com solução Tyrode

suplementado com 4mM de Blebbistatina (Abcam), que inibe a interação actina-miosina sem alterar a atividade elétrica do coração (DOU; ARLOCK; ARNER, 2007).

Para registrar os sinais elétricos durante o PA, foram utilizados microeletrodos de vidro de borossilicato (resistência 10-40 M Ω) obtidos através de um *puller* de micropipetas preenchidos com solução KCl 3M e inseridos num *holder* (MEH1SF12, World Precision Instrument, Inc.) encaixado num micromanipulador (MM33 links, World Precision Instrument, Inc.), que faz conexão com a entrada de um pré-amplificador (Electro 705, World Precision Instrument, Inc.). Os microeletrodos foram colocados no epicárdio do ventrículo esquerdo e antes de empalar o tecido a leitura do microeletrodo foi ajustado a linha de base (zero).

Para registrar os transientes de Ca²⁺, foi utilizada a técnica chamada de *pulsed local field fluorescence microscopy* (PLFFM) descrita por Escobar AL e colaboradores, que permite avaliar parâmetros fisiológicos sob frequência de estimulação externa controlada mediada por um gerador de pulsos e detecção da luz emitida pelos indicadores fluorescentes presentes no tecido (FERREIRO; PETROSKY; ESCOBAR, 2012; KORNIEYEV et al., 2012; MEJÍA-ALVAREZ et al., 2003; VALVERDE et al., 2010).

Nesta técnica, a luz de excitação e a luz emitida se propagam através de uma fibra óptica colocada na superfície do coração. A fonte de luz de excitação provém de um laser yag (do inglês, *yttrium aluminium garnet*) que emite luz verde (532 nm). Os pulsos de luz são focados numa fibra ótica através de uma objetiva (200 μ m diâmetro, 0,67 AN). Essa luz emitida volta pela mesma fibra, e ela é filtrada e focada em um fotodiodo de avalanche (Perkin Elmer, Waltham, MA). Os registros são obtidos colocando a fibra no tecido como mostrado na **Fig. 10**.

Os sinais amplificados foram digitalizados (NI USB 6281, National Instrument, EUA) e armazenados no computador para posterior análise utilizando o software em base LabVIEW. Dentre os parâmetros analisados para os diferentes experimentos, encontram-se a duração do potencial de ação à 30 e à 90% da repolarização (APD30 e APD90) tanto no ventrículo quanto no átrio. Ainda, através de protocolos específicos de estimulação foi

avaliada a suscetibilidade para deflagrar pós-potenciais precoces e tardias assim como atividade deflagrada (do inglês *triggered activity*). Enquanto aos transitórios de Ca^{2+} , foram aferidos parâmetros relacionados com a cinética dos mesmos como a constante de tempo tau (τ), o tempo ao pico e área em baixo da curva (AUC, do inglês *Area Under the Curve*).

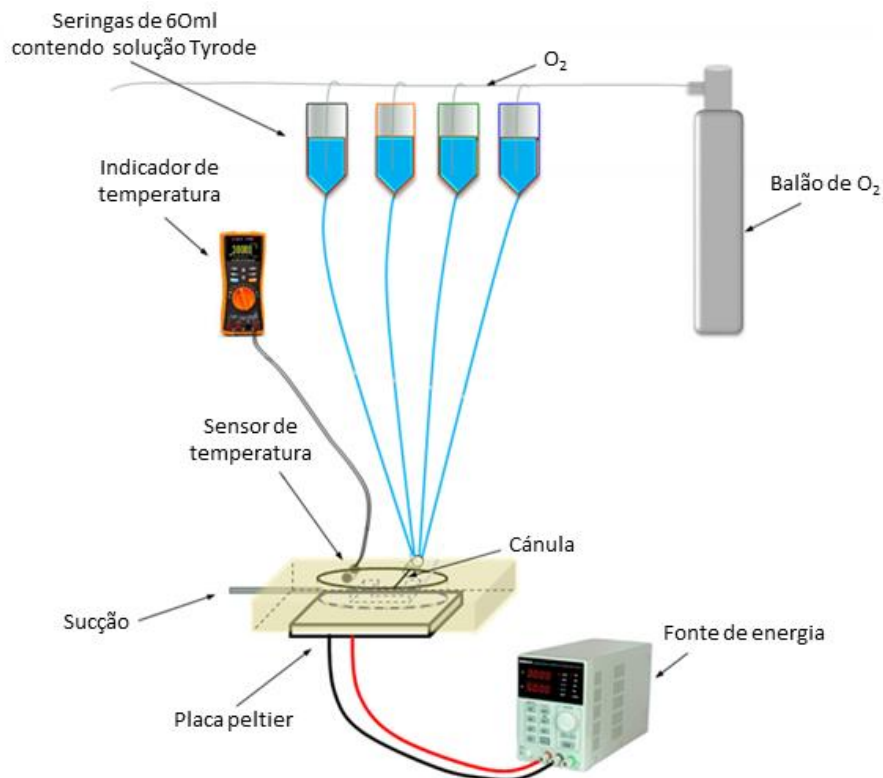


Figura 9: Esquema do sistema de perfusão retrograda de Langendorff (Adaptado de Aguilar-Sanchez et al., 2017).

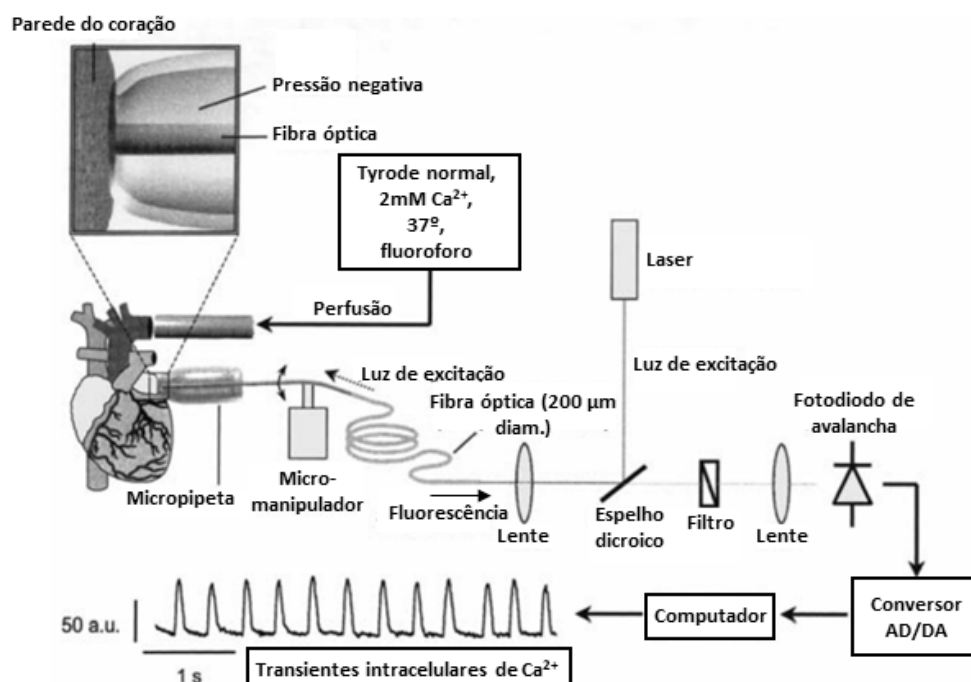


Figura 10: Diagrama esquemático do Pulsed Local Field Fluorescence Microscopy (PLFFM) (Adaptado de Mejía-Alvarez et al., 2003).

4.11. ISOLAMENTO DE CARDIOMIÓCITOS

Para avaliar as correntes iônicas pela técnica de *Patch clamp* (descrita abaixo), isolamos os cardiomiócitos do ventrículo esquerdo conforme descrito previamente (AFANASYEVA et al., 2004). Este procedimento combina a utilização da enzima colagenase do tipo 2 (Worthington Biochemical Corporation®) e da enzima protease XIV (Sigma-Aldrich®).

Os camundongos foram eutanasiados, como descrito anteriormente, e os corações foram extraídos e canulados pela artéria aorta em um sistema de Langendorff onde foram perfundidos com soluções aquecidas a 37°C e saturadas com O₂.

Para isolar os cardiomiócitos, inicialmente o coração foi perfundido com solução Tyrode contendo (em mM): NaCl 140; KCl 5,4; CaCl₂ 2; MgCl₂ 1; NaPO₄H₂ 0,33; HEPES 10 e glicose 10. O pH foi calibrado com NaOH em 7,4. Após 5 minutos de estabilização, o coração foi perfundido com solução Tyrode sem cálcio e com EGTA por 8 minutos (até parar de contrair) para logo depois ser perfundido durante 15 minutos com solução Tyrode sem cálcio (com EGTA) contendo 0,5 mg/ml de colagenase tipo 2 e 0,1 mg/ml de

protease tipo XIV. Finalmente, o coração foi perfundido com solução Tyrode sem cálcio durante 8 minutos com a finalidade de parar a digestão enzimática.

Finalizado o processo de digestão e lavagem, o coração foi removido do sistema de Langendorff e o ventrículo direito foi separado e disposto numa placa de vidro com solução Tyrode com 500 μM de CaCl_2 . Os cardiomiócitos foram obtidos mediante a realização de cortes transversais e agitação mecânica com pinças. A suspensão de cardiomiócitos obtida foi guardada a 4°C por um período mínimo de 2h antes da obtenção dos registros eletrofisiológicos.

4.12. REGISTRO DE CORRENTES IÔNICAS (PATCH CLAMP)

As correntes iônicas foram registradas mediante a técnica de *Patch clamp* que permite registrar as propriedades dos canais iônicos (ADELMAN; SENFT, 1966).

Para isso, os cardiomiócitos previamente isolados foram transferidos para uma placa de baixa profundidade montada num microscópio invertido (Nikon) durante 10 minutos para se aderirem no fundo da mesma, antes de serem perfundidas com a solução chamada de solução externa que varia em função da corrente a ser registrada. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente (20-22°C) e as correntes iônicas foram registradas na configuração *whole-cell* (**Fig. 11**) com um amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments Inc.), conectado a um conversor analógico digital Digidata 1440 (Axon Instruments Inc.). A frequência de aquisição foi de 10 kHz e filtrado utilizando um filtro passa-baixa de 5 kHz.

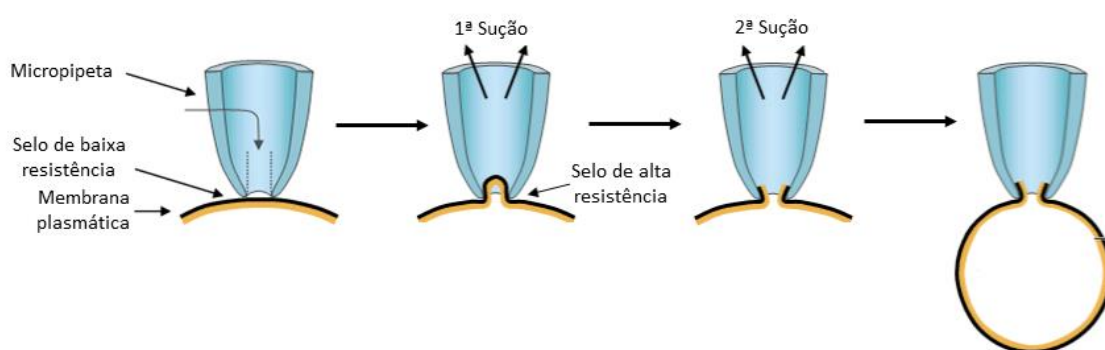


Figura 11: Diagrama da configuração *whole-cell* da técnica de Patch clamp.

Para realizar os registros, foram fabricadas micropipetas de borosilicato (World Precision Instruments Inc.) utilizando um puller (Sutter Flaming-Brown P-97, Sutter Instruments) com uma resistência de entre 1-3 M Ω e preenchidas com uma solução chamada de solução interna contendo (em mM): L-Asp 80; KH₂PO₄ 10; MgSO₄ 1; ATP-Na 3; EGTA-K 10; KCl 50; HEPES-K 5. O pH da solução foi ajustado para 7,2 com KOH.

Uma vez que as células se encontravam aderidas ao fundo da placa, começou-se a perfundir a placa com a solução externa. Para registrar as correntes de I_{to} , foi utilizada a seguinte solução externa (em mM): NaCl 86; MgCl₂ 1; HEPES-Na⁺ 10; KCl 4; CaCl₂ 0,5; CoCl₂ 2; dextrose 12 e Cloreto de TEA 50. O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH. Deixou-se perfundindo essa solução durante 10 minutos antes de realizar os registros para assim descartar as células que morreram já que essas células não irão se aderir no fundo da placa e flutuam sendo levadas pela solução de perfusão.

Após esse tempo, e com ajuda do micromanipulador, a micropipeta foi introduzida na solução do banho de células e descida até fazer contato com a célula. Depois, aplicou-se uma primeira sucção com auxílio de uma seringa de 1 ml com a qual uma pequena porção da membrana invagina-se no interior da pipeta formando-se um selo que evita a perda de cargas elétricas com uma resistência elétrica da ordem de gigaohm (G Ω). Esse gigaselo é uma zona de contato entre a membrana e a pipeta que não permite a perda de cargas elétricas. Em seguida, aplicou-se uma segunda sucção para romper a membrana e permitir o contato direto entre a solução interna da micropipeta e o interior da célula, obtendo a configuração *whole-cell*. Nesse momento, só se registra a corrente capacitiva, isto é, a corrente necessária para carregar o interior da célula desde -50 até -60 mV. Para isso, aplicamos um pulso hiperpolarizante de 10 ms de duração desde -50 até -60 mV partindo de um *holding potential* de -40 mV. Essa corrente capacitiva é compensada eletricamente a 80% com o intuito de minimizar erros de voltagem durante o experimento.

Após a ruptura da membrana, combinam-se a solução interna da pipeta e o interior da célula, sendo possível fixar a voltagem da membrana e registrar a corrente iônica resultante de todos os canais presentes na membrana. Assim, mediante a

utilização de soluções específicas (internas e externas) e utilizando bloqueadores químicos específicos que bloqueiam correntes que não são do nosso interesse, foi possível isolar a corrente iônica de interesse. Os protocolos utilizados foram controlados usando o programa Clampex 10.7 do software pClamp 10.2 (Axon Instruments, Inc.).

4.12.1. Registro da corrente transitória de saída de potássio

Antes de registrar a corrente transitória de saída de potássio (I_{to}), foram eliminadas as outras correntes dependentes de voltagem tanto com bloqueadores químicos quanto com a aplicação de uma voltagem específica. Para isso, e como descrito previamente, os cardiomiócitos foram perfundidos com uma solução externa contendo nicardipina e TEA, que bloqueiam a corrente de Ca^{2+} e a corrente de K^+ retificadora tardia respectivamente. Além disso, o *holding potential* das células foi de -60 mV, potencial ao qual encontram-se inativados os canais de Na^+ .

Para registrar a corrente I_{to} , aplicou-se pulsos despolarizantes de 500 ms de duração, desde -30 até +50 mV com acréscimos de 10 mV, a partir de um holding potential de -60 mV, a uma frequência de 0,1 Hz. Nesse *holding potential* todos os canais de I_{to} estão em estado de repouso e, portanto, disponíveis para se abrirem, e a +50 mV todos os canais estão abertos.

Com este protocolo, foi registrada simultaneamente tanto a corrente I_{to} quanto a corrente sustentada (I_{ss}). A corrente I_{to} inativa-se aos 200 ms enquanto a I_{ss} é independente do tempo, isto é, só se inativa quando para a estimulação. Assim, utilizando um protocolo de 500 ms de duração foi possível separá-las. Inicialmente, as duas correntes estão presentes, quando aparece a amplitude máxima da corrente I_{to} . Porém, no final do estímulo, a I_{to} está totalmente inativada e o que se registra é somente I_{ss} . Portanto, subtraindo digitalmente a amplitude da I_{ss} ao final do estímulo foi possível obter os valores de amplitude máxima da corrente I_{to} .

Uma vez obtido o valor da amplitude da corrente I_{to} , foi normalizado pela capacitância dessa célula. Esse quociente é conhecido como densidade da corrente e é

expresso em picoamperes por picofarádio (pA/pF) e permite comparar amplitudes de I_{to} de células de tamanhos diferentes.

4.13. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A função cardíaca foi avaliada *in vivo* por imageamento utilizando ressonância magnética nuclear (RMN). Para a realização da mesma, os animais foram anestesiados com 1,5% de isoflurano em um fluxo de 1L/min de oxigênio. O estudo de RMN de alta resolução para pequenos animais foi realizado com o auxílio do equipamento Varian 7.0 Tesla (Varian Inc., Palo Alto, CA, EUA). A temperatura corporal dos camundongos anestesiados foi mantida a 37 °C por um sistema de ar quente acoplado ao aparelho e a frequência cardíaca dos animais foi monitorada (400-500 bpm). Os parâmetros utilizados para a aquisição das imagens foram: Tempo de Repetição (TR) = 6.8 ms, Tempo de Exposição (TE) = 1.9 ms, *Frames* = 15, Espessura = 241 mm, matriz = 128 x 128, Campo de Visão (FOV) = 30 x 30 mm. As imagens foram analisadas com software Osirix Imaging 2 e foram determinados os seguintes parâmetros: área do ventrículo esquerdo em sístole e diástole, os volumes sistólico e diastólico finais, a fração de ejeção (FE) e o volume ejetado ou volume sistólico (*stroke volume*).

4.14. DOSAGEM DOS NÍVEIS DE INSULINA

Para aferir a concentração de insulina no soro, primeiramente o sangue foi colhido da veia orbital mediante um capilar e mantido a temperatura ambiente durante 30 minutos e depois centrifugado (800G, 15 minutos, 4 °C). O soro foi coletado e armazenado a -80 °C até a sua utilização. Os níveis de insulina sérica foram medidos pela técnica de radioensaio (RIA, do inglês *Radioimmunoassay*) no soro dos camundongos do grupo WT CNTRL e WT DT2 seguindo as instruções do fabricante do kit (MP Biomedical, EUA) e mensurados como $\mu\text{UI/ml}$.

4.15. DOSAGEM DOS NÍVEIS DE TRIGLICERÍDEOS E COLESTEROL

Os níveis séricos de triglicerídeos e colesterol foram mensurados conforme orientações do fabricante utilizando os kits para determinação dos triglicerídeos ou

colesterol total por metodologia enzimática-calorimétrica (Gold Analisa, Brasil). O soro foi coletado como descrito previamente.

4.16. DOSAGEM DE NÍVEIS DE UREIA

Da mesma maneira que para a dosagem dos níveis de triglicédeos e colesterol, os níveis séricos de ureia foram mensurados utilizando um kit de determinação de ureia por metodologia enzimática-calorimétrica (Bioclin).

4.17. DETEÇÃO DE CITOCINAS:

Para mensurar a concentração das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no soro dos camundongos, foi utilizado um kit de ELISA (R&D systems, EUA). As leituras do ELISA foram feitas com o equipamento SpectraMax M3 (Molecular Devices, EUA).

4.18. ISOLAMENTO MITOCONDRIAL

O protocolo para o isolamento de mitocôndrias dos corações dos animais de estudo foi adaptado do protocolo descrito por Affourtit e colaboradores (AFFOURTIT; QUINLAN; BRAND, 2012).

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical como descrito previamente e rapidamente depois, os corações foram extraídos, pesados e acondicionados em tampão *Chappel-Perry 1* (CP1) frio composto por (mM): KCl 100; Tris-HCl 50 e EGTA 2. O pH foi calibrado para 7,2 a temperatura ambiente. Os corações foram então cortados com auxílio de uma lâmina e lavados 5 vezes em tampão CP1 (até conseguir eliminar os restos de sangue). Após a lavagem com CP1, os pedaços de tecido foram transferidos para o meio *Chappel-Perry 2* (CP2) composto por (mM): KCl 100; Tris-HCl 50; EGTA 2; MgCl₂ 5; ATP 1; 1% de BSA e 250 U/100 ml de protease tipo VIII (Sigma Aldrich). O pH foi calibrado para 7,4 na proporção de 1 ml para cada 100 mg de peso inicial e colocado sob agitação suave durante 6 minutos para facilitar a digestão das proteínas.

Na sequência, o tecido foi lisado em homogeneizador (Ultra turrax, IKA) por 3 vezes durante 3-4 segundos e o homogenato resultante foi novamente colocado sob agitação suave durante 5 minutos. Posteriormente, foi centrifugado a 490G durante 10 minutos a 4°C. Após essa primeira centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e submetido a uma segunda centrifugação a 10368G durante 10 minutos a 4°C, ao final da qual ocorre a formação de um precipitado rico em mitocôndrias. Antes da terceira e última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspendido em CP1, a fim de lavar a preparação da protease presente no CP2. Essa preparação foi centrifugada a 10368G durante 10 minutos a 4°C. Ao final, o precipitado obtido foi resuspendido em 200 µl de tampão CP1.

As preparações de mitocôndrias isoladas obtidas foram submetidas a experimentos de respirometria de alta resolução (descrito em 4.18) a fim de verificar a qualidade da preparação obtida. A dosagem de proteína da preparação obtida foi realizada pelo método de Folin descrito por Lowry e colaboradores (LOWRY et al., 1951) e posteriormente utilizada para análise da cinética enzimática da catalase mitocondrial.

4.19. RESPIROMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO E MEDIDA DA PRODUÇÃO DE H₂O₂ POR FLUORESCENCIA

Para estudar o consumo de oxigênio mitocondrial nos diferentes estados respiratórios, foi utilizado um sistema de respirometria de alta resolução (O2k, OROBOROS Instruments). Por outro lado, a medida da produção de H₂O₂ mitocondrial foi aferida mediante espectrofotômetro de fluorescência.

Após o processo de isolamento mitocondrial, as amostras das mesmas foram colocadas nas cubetas do sistema de oxigrafia pareando sempre uma amostra CNTRL com uma amostra DT2. As cubetas foram seladas imediatamente após a adição das amostras, aguardando entre 5 a 10 minutos para estabilização do sistema antes do início das titulações.

Com o objetivo de explorar os diferentes substratos oxidáveis pelo sistema de transporte de elétrons (STE), foi realizado o seguinte protocolo de titulação para avaliar

o consumo de oxigênio com os seguintes substratos e inibidores: (i) 5mM Piruvato / 2.5mM Malato (substratos para o complexo I); (ii) 10mM Glutamato; (iii) 10 μ M ADP (que estimula o estado máximo fosforilativo); (iv) 1mM ADP saturante; (v) 10mM succinato (substrato para o complexo II); (vi) 0,2 μ g/ml oligomicina (inibidor da ATP sintase que retorna o consumo de O₂ a valores próximos ao estado não fosforilativo em ausência de ADP) e (vii) 2 μ M antimicina A (inibidor do complexo III que permite avaliar o consumo de O₂ não mitocondrial ou residual).

Para medir a produção de H₂O₂ mitocondrial, as mitocôndrias isoladas foram colocadas na cubeta contendo 200 μ l de tampão de respiração MiR05 (do inglês *Mitochondrial Respiratory solution* 05) suplementado com 5 μ l de superóxido dismutase, 5,5 μ l de Amplex Red (Invitrogen) e 2 U/ml de peroxidase. O MiR05 é composto por (mM): EGTA 0,5; MgCl₂ 3; K-MES 60; taurina 20; KH₂PO₄ 10; HEPES 20; sacarose 110 e 1 g/l BSA livre de ácidos graxos. O pH foi ajustado para 7,1.

A peroxidase utiliza o Amplex Red como doador de elétrons para reduzir o H₂O₂ a água, gerando um composto fluorescente denominado resorufina que é capaz de ser detectado pelo sensor de fluorescência. Os substratos que foram adicionados foram: Piruvato/Malato + Glutamato (5,5mM piruvato; 2,5mM malato; 10mM glutamato); 10mM Succinato; 1mM ADP; 0,2 μ g/ml oligomicina, 2 pulsos de 0,5 μ M de FCCP (protonóforo e desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial) e 2 μ M antimicina A.

4.20. ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE

A atividade da enzima da matriz mitocondrial citrato sintase (CS) é o marcador de conteúdo mitocondrial mais comumente utilizado (LARSEN et al., 2012). Assim, o protocolo aqui utilizado em mitocôndrias isoladas, foi adaptado daquele descrito por Eigentler e colaboradores (EIGENTLER et al., 2012).

Esse protocolo é baseado na reação da CoA-SH com o ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoico (DNTB) formando ácido 2-nitro-5-benzoico (TNB) que pode ser monitorado a 420 nm em espectrofotômetro com leitor de placas (VICTOR plate reader, PerkinElmer).

A solução tampão utilizada é composta por (mM): Tris-Cl 20; DNTB 0,3; EDTA 2 e acetil-CoA 0,3. O pH foi calibrado para 8,0. Para cada atividade foram utilizados 5 µg/ml de proteína, que foi disparada com a adição de 5 mM de oxalacetato.

A atividade foi normalizada pela curva padrão de TNB e expressa em $\text{nmol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

4.21. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para realizar a análise estatística foram utilizados os programas Prism 7 (GraphPad, EUA) e OriginPro8 (OriginLab, EUA) os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM, do inglês *Standard Error Mean*). As análises foram realizadas utilizando o teste t de Student, One-way ANOVA e Two-way ANOVA, conforme a necessidade das amostras analisadas. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$ para ser considerado como significativo.

5. RESULTADOS

5.1. ESTABELECIMENTO DE UM MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL DE DT2 UTILIZANDO HFD (45%) E BAIXA DOSE DE ESTREPTOZOTOCINA.

Após 6 semanas do começo da indução a DT2, os animais foram submetidos a diversos exames bioquímicos para constatar o estado metabólico dos mesmos (**Fig. 12**). Assim, os animais alimentados com HFD e injetados com duas doses de estreptozotocina (STZ) (WT DT2) apresentaram um incremento na concentração de glicose no sangue em comparação com os demais grupos estudados (**Fig. 12A**) e níveis similares na concentração de insulina sérica, em relação ao grupo WT CNTRL. Já os animais WT HFD apresentaram um incremento da insulina sérica mostrando que a dieta foi capaz de induzir uma situação de resistência à insulina (**Fig. 12B**). Essa resistência à insulina pode ser aferida mediante testes de tolerância a glicose ou insulina e mediante o índice HOMA. Quando aferido este último, foi observado que os animais WT DT2 apresentaram maior índice HOMA quando comparados aos animais WT CNTRL (**Fig. 12C**).

Além disso, os animais WT DT2 apresentaram um discreto, mas significativo, aumento de peso corporal quando comparados tanto com os animais controle (WT CNTRL), quanto com aqueles que foram alimentados só com HFD (WT HFD) ou ainda com aqueles alimentados com dieta normal e injetados com duas doses de STZ (WT STZ) (**Fig. 12D**). Mesmo que a diferença do peso corporal não fosse muito elevada, os animais DT2 apresentaram maior quantidade de gordura retroperitoneal e epididimária (**Figs. 12 E e F**).

Por outro lado, como é sabido, níveis séricos de triglicerídeos e colesterol podem estar alterados como consequência do DT2. Assim, foram aferidos ambos nos animais WT CNTRL e WT DT2, observando-se um aumento de ambos nos animais WT DT2 (**Figs. 12 G e H**). Também, diante o DT2 pode aparecer um aumento dos corpos cetônicos, como consequência de resistência à insulina e maior utilização de ácidos graxos. Sendo assim, avaliamos a concentração circulante de beta-hidroxibutirato (β -OH-butirato) em

ambos grupos. Como observado na **Fig. 12I** não observamos diferença na concentração de β -OH-butirato.

Em conjunto, esses resultados indicaram que o protocolo experimental de WT DT2 promove alterações metabólicas consistentes com o desenvolvimento do DT2.

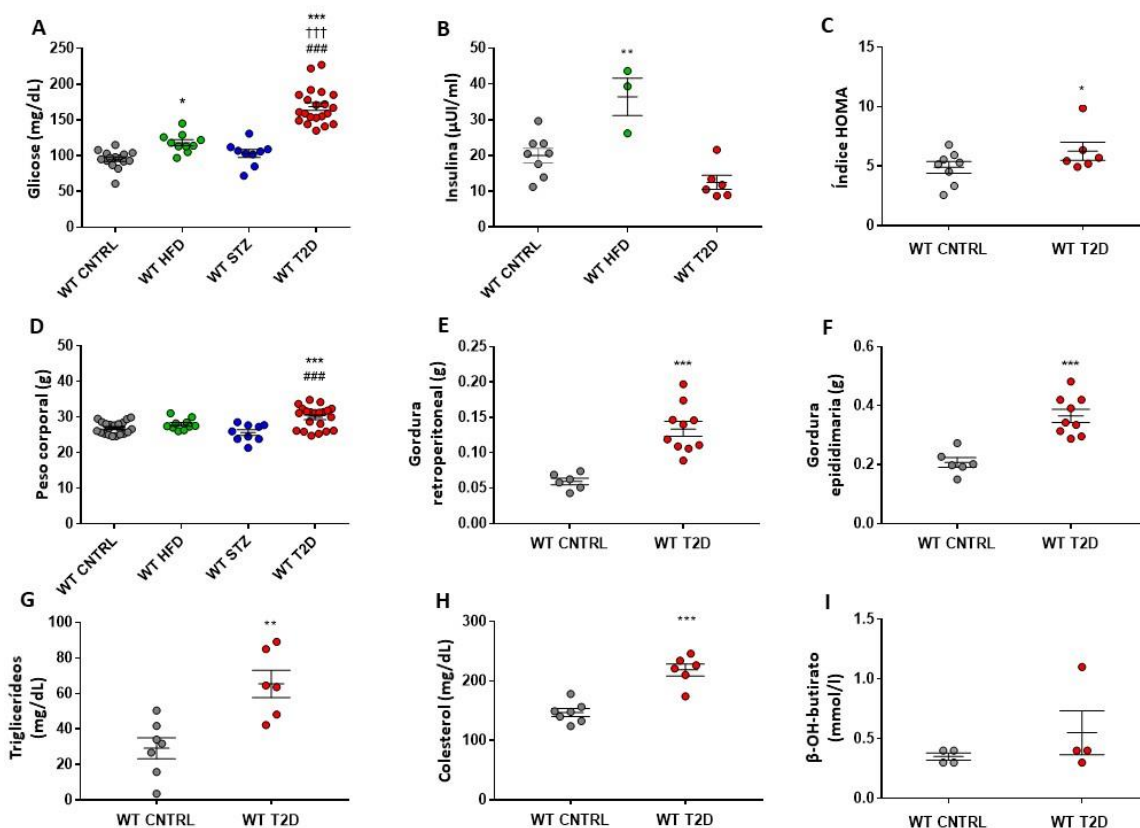


Figura 12. A combinação da HFD e baixa dose de STZ reproduz as alterações metabólicas do DT2. (A) Concentração de glicose no sangue. (B) Concentração de insulina sérica. (C) Índice HOMA. (D) Peso corporal dos grupos experimentais. Peso da gordura (E) retroperitoneal e (F) epididimária. Concentração de (G) Triglicérides e (H) Colesterol no soro dos animais WT CNTRL e WT DT2. (I) Concentração circulante de β -OH-butirato. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs WT CNTRL; ** $p < 0,01$ vs WT CNTRL; *** $p < 0,001$ vs WT CNTRL; ### $p < 0,001$ vs WT STZ; +++ $p < 0,001$ vs WT HFD.

Para avaliar os efeitos da dieta HFD em conjunto com as doses de STZ sobre a utilização de glicose foi aferido a concentração desta no sangue após da administração de glicose exógena ou de insulina (**Fig. 13**). A **Fig. 13A** mostra a concentração de glicose no sangue nos diferentes tempos de medição em todos os grupos experimentais estudados, indicando que o grupo que recebeu HFD + STZ (grupo WT DT2) apresentou maiores concentrações de glicose nos 30, 60 e 120 minutos após da administração.

Quantitativamente, esse resultado pode ser medido pela área embaixo da curva (AUC). Nesse caso, embora o grupo WT STZ mostrasse um acréscimo deste valor em comparação ao grupo WT CNTRL e WT HFD, a combinação de HFD + STZ resultou em um aumento significativo da AUC registrada em comparação com todos os grupos controles utilizados (**Fig. 13B**). Deste modo, visando avaliar se a capacidade de captar a glicose pelos tecidos nesses animais está associada com a resistência à insulina, foi mensurada a concentração de glicose sanguínea em diferentes tempos após a administração de insulina exógena. As **Figs. 13 C e D** mostram que, mesmo com a administração de insulina, os animais alimentados com HFD que receberam STZ continuaram com níveis mais elevados de glicose no sangue em comparação aos outros grupos experimentais.

Esses resultados (**Figs. 12 e 13**) mostraram que a combinação da dieta utilizada complementada com duas doses de STZ, promoveu um detrimento do estado metabólico dos animais, incluindo aumento de peso corporal e aumento de glicose sanguínea, promovida tanto pela redução nos níveis de insulina quanto pela redução da ação desta sobre as células, condições características do modelo de diabetes de tipo 2.

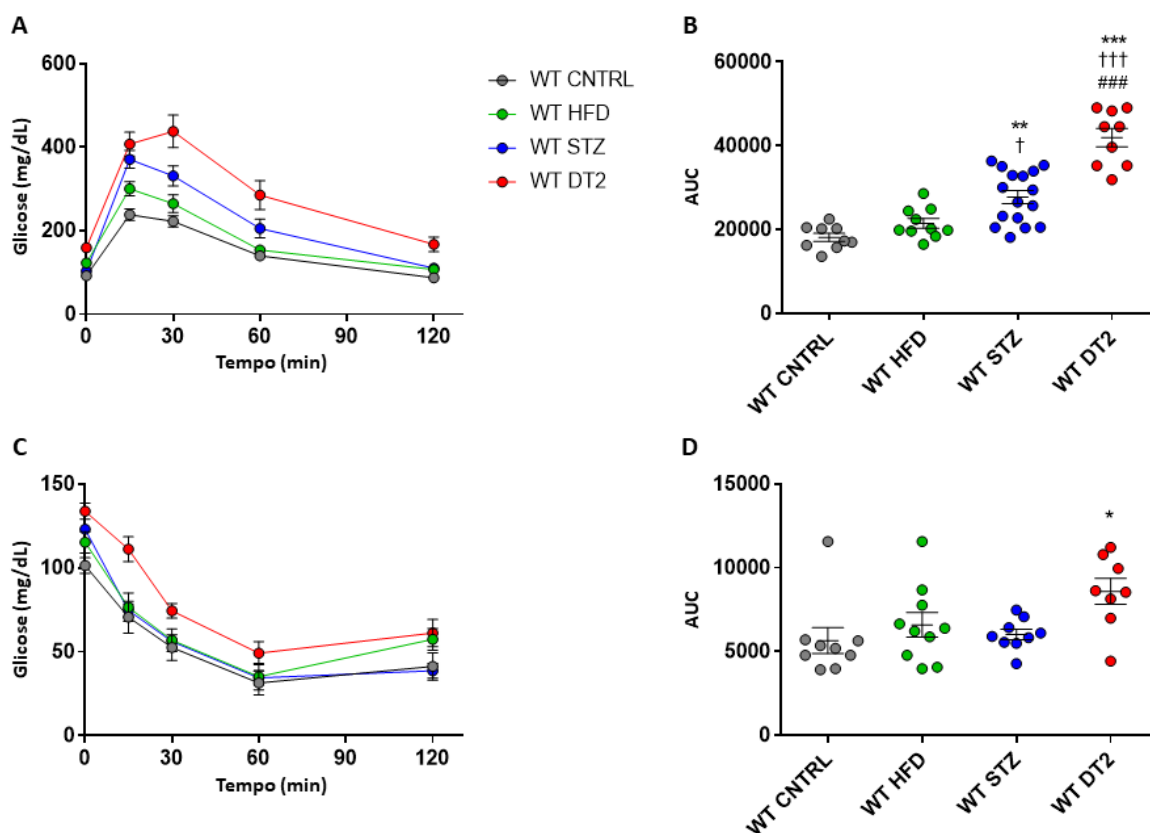


Figura 13. A combinação da HFD e baixa dose de STZ induz resistência à insulina. Níveis de glicose no sangue após de 15, 30, 60 e 120 minutos da injeção de glicose para o IPGTT (A) e de insulina para o IPITT (C). (B e D) AUC dos correspondentes testes de IPGTT (B) e IPITT (D). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs WT CNTRL; ** $p < 0,01$ vs WT CNTRL; *** $p < 0,001$ vs WT CNTRL; ### $p < 0,001$ vs WT STZ; † $p < 0,05$ vs WT HFD; ††† $p < 0,001$ vs WT HFD.

Como já é sabido, existe uma estreita relação entre a função cardíaca e a função renal sendo que as alterações cardiovasculares são as responsáveis de mais da metade das mortes nos pacientes com insuficiência renal. Além disso, os pacientes que sofrem algum tipo de doença renal severa multiplicam por 10 o risco de desenvolver alterações cardiovasculares (PÁLSSON; PATEL, 2014).

Por outro lado, uma das principais complicações a longo prazo do DT2 é a alteração da função renal sendo que cerca do 40% dos pacientes DT2 a desenvolvem, e isto aumenta a probabilidade de desenvolver complicações cardiovasculares (PECOITS-FILHO et al., 2016). Com o intuito de avaliar a função renal no modelo de DT2 aqui estudado, mensuramos parâmetros tais como peso dos rins (Fig. 14 A e B), relação do peso dos rins vs peso corporal (Fig. 14 C e D) e a concentração sérica de ureia (Fig. 14E).

Os resultados mostraram que não existe alteração da função renal nos animais DT2 quando comparados com os animais CNTRL.

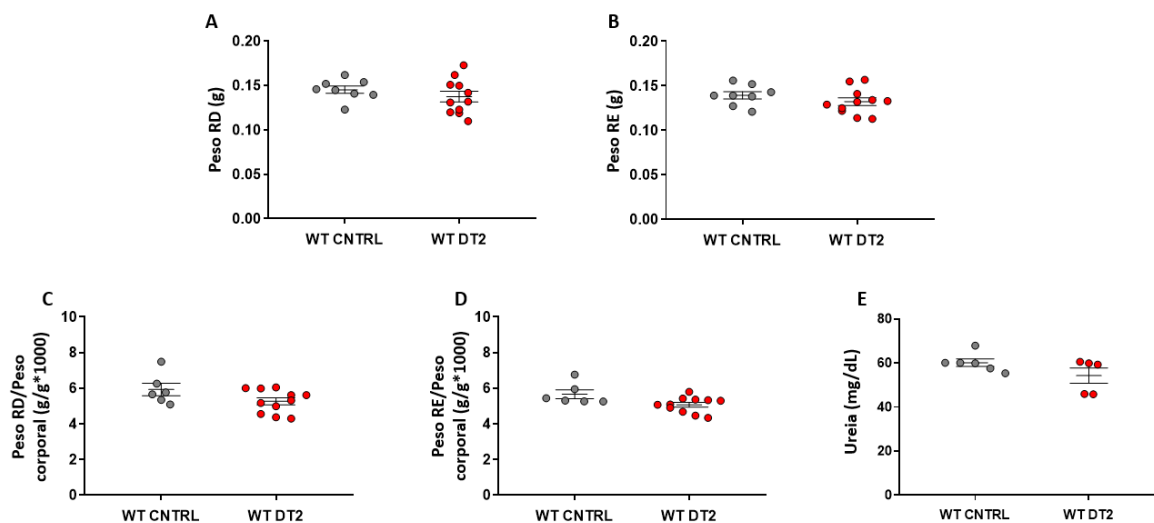


Figura 14: A combinação da HFD e baixa dose de STZ não altera a função renal. (A) Peso do rim direito (RD). (B) Peso do rim esquerdo (RE). Relação (C) peso RD/peso corporal e (D) peso RE/peso corporal. (E) Concentração sérica de ureia. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

5.2. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ELÉTRICAS NO MODELO EXPERIMENTAL DE DT2.

Para investigar os efeitos da DT2 na função elétrica cardíaca, foi realizado o ECG *in vivo* nos animais de todos os grupos (Fig. 15). A partir dos traçados (Fig. 15A), foram medidos os intervalos RR e QJ (Figs. 15 B e C). Os animais WT DT2 apresentaram um incremento da frequência cardíaca refletido por uma diminuição da duração do intervalo RR (Fig. 15B). A análise dos registros mostrou que os animais do grupo WT DT2 apresentaram um maior intervalo QJ, quando comparado aos animais dos outros grupos, indicando possíveis alterações na repolarização ventricular (Fig. 15C).

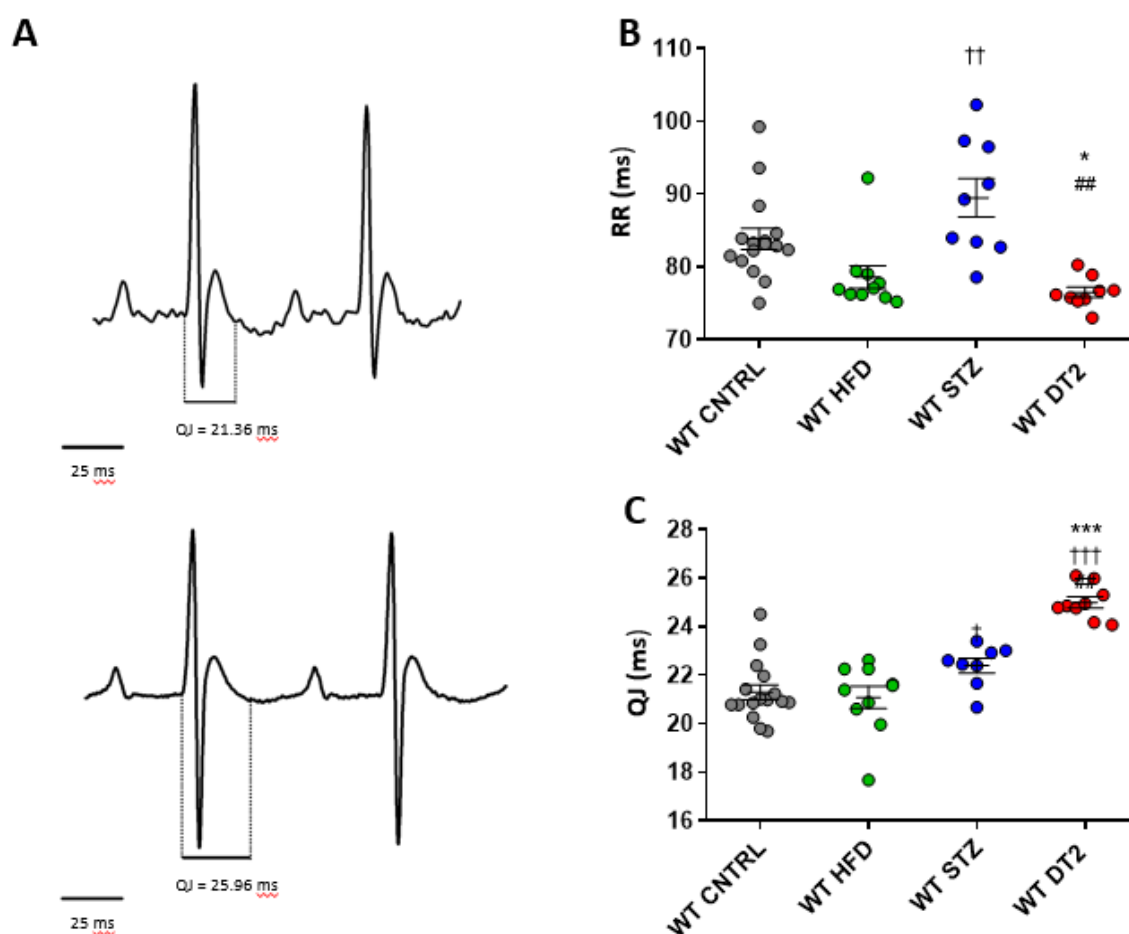


Figura 15: O DT2 prolonga a duração do intervalo QJ. (A) Traçados representativos do ECG dos animais do grupo WT CNTRL (acima) e WT DT2 (abaixo) indicando a duração do intervalo QJ. (B) Gráfico da duração do intervalo RR (C) e do intervalo QJ de todos os grupos experimentais. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs WT CNTRL; *** $p < 0,001$ vs WT CNTRL; ## $p < 0,01$ vs WT STZ; † $p < 0,05$ vs WT HFD; †† $p < 0,01$ vs WT HFD; ††† $p < 0,001$ vs WT HFD.

Para corroborar as alterações ventriculares, foi avaliado simultaneamente *ex vivo* o potencial de ação (PA) e o manejo de cálcio no coração inteiro nos animais de ambos grupos experimentais (**Fig. 16**). Os resultados mostraram um prolongamento no PA ventricular à 90% da repolarização nos animais DT2 (**Fig. 17A**) quando comparados com os controles enquanto que não houve diferença na duração do potencial de ação à 30 % da repolarização (APD30).

Ainda, como é sabido, tanto alterações na duração do potencial de ação quanto o próprio DT2, podem acarretar alterações no manejo de cálcio dentro dos cardiomiócitos (FERREIRO; PETROSKY; ESCOBAR, 2012).

Estes experimentos pioneiros no Brasil, nos permitiram avaliar de maneira simultânea e a temperatura constante de 34 °C, o comportamento elétrico e o manejo de Ca^{2+} em coração inteiro em nível sub-celular. Assim, como mostrado na **Fig. 17B** avaliamos algumas propriedades da cinética dos transientes de Ca^{2+} e observamos que a constante de tempo tau (τ), que indica o tempo que demora para o Ca^{2+} voltar aos níveis diastólicos, é menor nos animais DT2 quando comparado com os animais controle. Entretanto, não houve diferenças no tempo ao pico desses transientes nem na AUC.

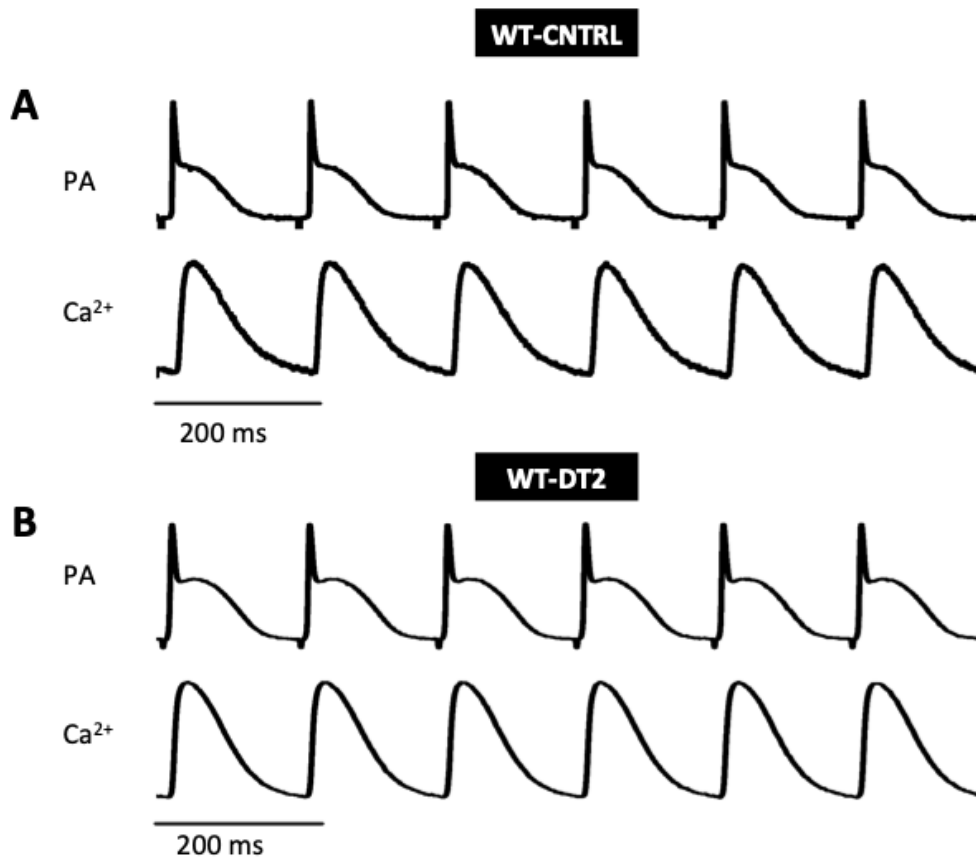


Figura 16: Traçados representativos de potencial de ação e transiente de cálcio no grupo (A) controle e (B) DT2 no ventrículo. PA: potencial de ação Ca^{2+} : transiente de cálcio. Registros obtidos a 34 °C a frequência de estimulação de 6 Hz.

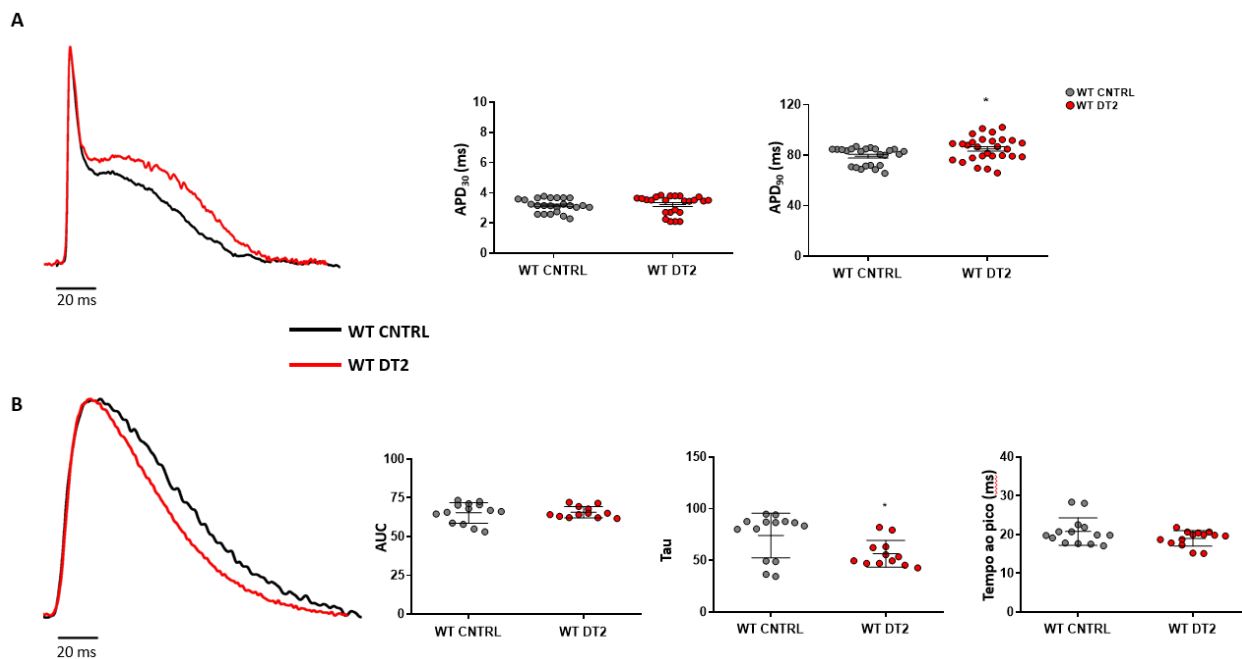


Figura 17: O DT2 prolonga a duração do potencial de ação e diminuiu o tempo de recepção de cálcio no ventrículo. (A) Traçados representativos do PA ventricular superimposto ao controle (CNTRL = preto) e DT2 (vermelho). Os gráficos da direita sintetizam os resultados obtidos. (B) Traçados representativos de transiente de cálcio (Ca^{2+}) na situação controle (CNTRL = preto) e DT2 (vermelho). As figuras da direita sumarizam os resultados obtidos. Registros obtidos a 34 °C a frequência de estimulação de 6 Hz. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão da média. * $p < 0,05$.

Dentre as correntes repolarizantes presentes no coração do camundongo, encontra-se a corrente transitória de saída de potássio denominada Ito, a qual é a principal corrente repolarizante nestes animais que determina a duração do potencial de ação cardíaco. Diante isto, foi avaliada a dita corrente.

5.3. MECANISMOS IÔNICOS SUBJACENTES AS ALTERAÇÕES ELÉTRICAS OBSERVADAS.

Como comentado acima, a corrente Ito é fundamental na repolarização ventricular precoce do potencial de ação nos camundongos, determinando a fase 1 do mesmo assim como a entrada de cálcio nos cardiomiócitos e a duração do PA. Para estudar esta corrente, foi avaliada a densidade de corrente em cardiomiócitos isolados pela técnica de *Patch clamp*. As análises mostraram que as células provenientes de animais com DT2 apresentaram uma redução da corrente Ito quando comparadas com as de animais controle (**Figs. 18 A e B**). Assim, a redução na saída seria pelo menos em parte responsável pelo prolongamento do potencial de ação ventricular e

consequentemente com o incremento no intervalo QJ do eletrocardiograma nos animais WT DT2.

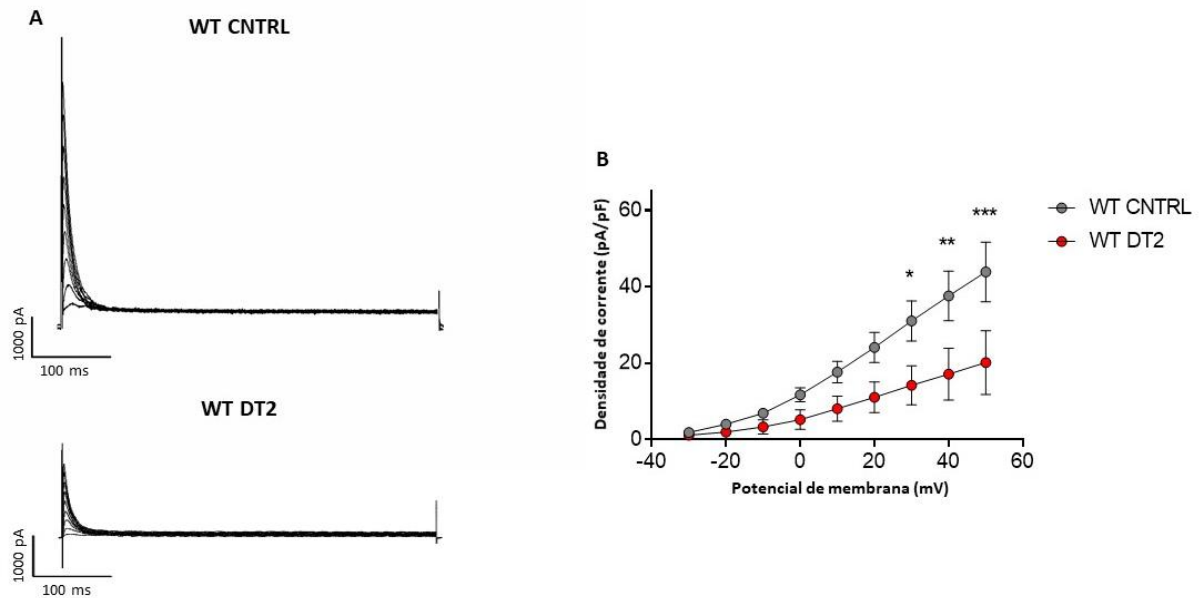


Figura 18: O DT2 diminui a densidade da corrente Ito. (A) Registro da corrente Ito nos cardiomiócitos isolados dos corações de camundongos WT CNTRL (acima) e WT DT2 (abaixo). (B) Gráfico da densidade da corrente Ito em função do potencial de membrana dos cardiomiócitos dos animais WT CNTRL e WT DT2. Resultados apresentados como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.4. ESTUDO DO POTENCIAL ARRITMOGÊNICO.

Problemas na repolarização podem predispor a aparição de eventos arrítmicos. Nesse contexto, os animais WT CNTRL e WT DT2 foram submetidos a um protocolo *in vivo* de indução a arritmias (caf/dob) com o fim de avaliar a susceptibilidade e gravidade de eventos arrítmicos. Os resultados mostraram que o modelo de DT2 promove o desenvolvimento de arritmias cardíacas em comparação ao estado controle (Figs. 19 A e B).

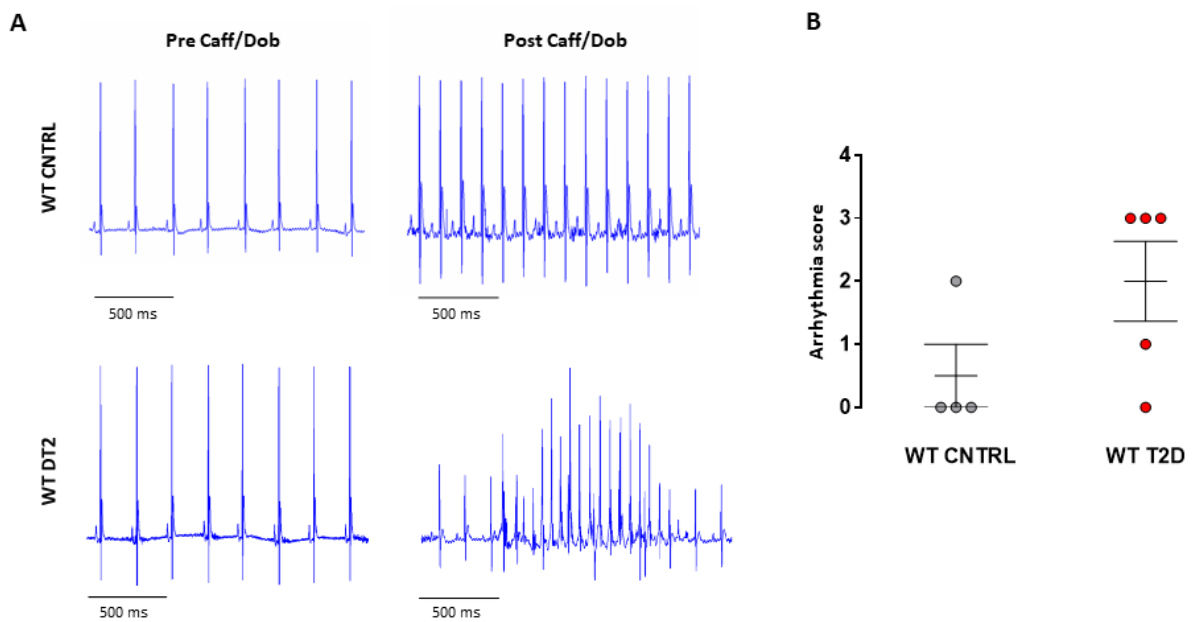


Figura 19: O DT2 aumenta a susceptibilidade a desenvolver arritmias *in vivo*. (A) Registro de ECG antes (esquerda) e depois (direita) da injeção de cafeína (120 mg/kg i.p.) e dobutamina (50 µg/kg i.v.) durante o protocolo de arritmias nos animais WT CNTRL (acima) e WT DT2 (abaixo). (B) Gráfico da quantificação dos eventos arrítmicos em função da severidade seguindo a seguinte pontuação (score): 1 extrasístole; 2 bigeminismo; 3 taquicardia ventricular e 4 fibrilação ventricular.

Ainda, nos experimentos *ex vivo*, foi observado que em 6/7 animais DT2 mostraram eventos arrítmicos quando realizados protocolos específicos de estimulação utilizando um extra-pulso (S1-S2) comparando com os animais CNTRL (1/6) (**Fig. 20**), sendo que os principais eventos arrítmicos observados foram desde pós-potências precoces até atividade deflagrada.

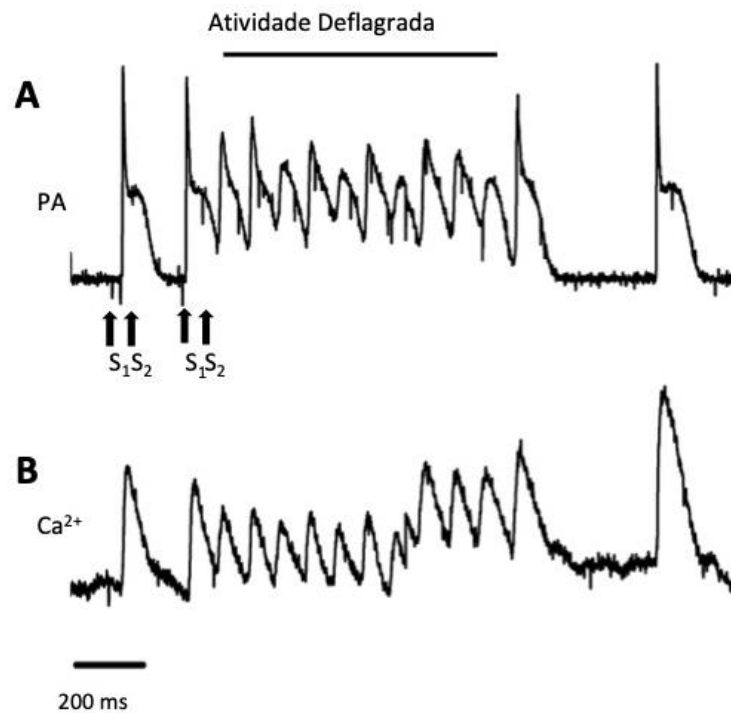


Figura 20: O DT2 produz aumento de eventos arritmicos ventriculares *ex vivo*. (A) Traçado representativo de um registro de potencial de ação onde se observa que a aplicação de um segundo estímulo dispara atividade deflagrada a qual desaparece depois de um tempo voltando a condição inicial. (B) Traçados representativos de Ca²⁺ durante a atividade deflagrada.

5.5. ESTUDO DA ATIVIDADE ELÉTRICA E DAS PROPRIEDADES DO TRANSIENTE DE CÁLCIO NO ÁTRIO.

Como é sabido a fibrilação atrial (FA) é a arritmia mais frequente na atualidade (HEERINGA et al., 2006; NATTEL; HARADA, 2014). Esta arritmia é mais preponderante em pacientes com diabetes que na população sadia (KARAM et al., 2017; SENSI et al., 2018; TADIC; CUSPIDI, 2015). Deste modo os estudos das propriedades elétricas do átrio são necessários visando entender se neste modelo aqui utilizado, além das alterações classicamente descritas no ventrículo, este também está alterado.

No presente trabalho foram registrados simultaneamente o PA atrial com o transiente de Ca²⁺ em temperatura controlada de 34 °C e frequência de estimulação de 6 Hz tal como mostrado na **Fig. 21**.

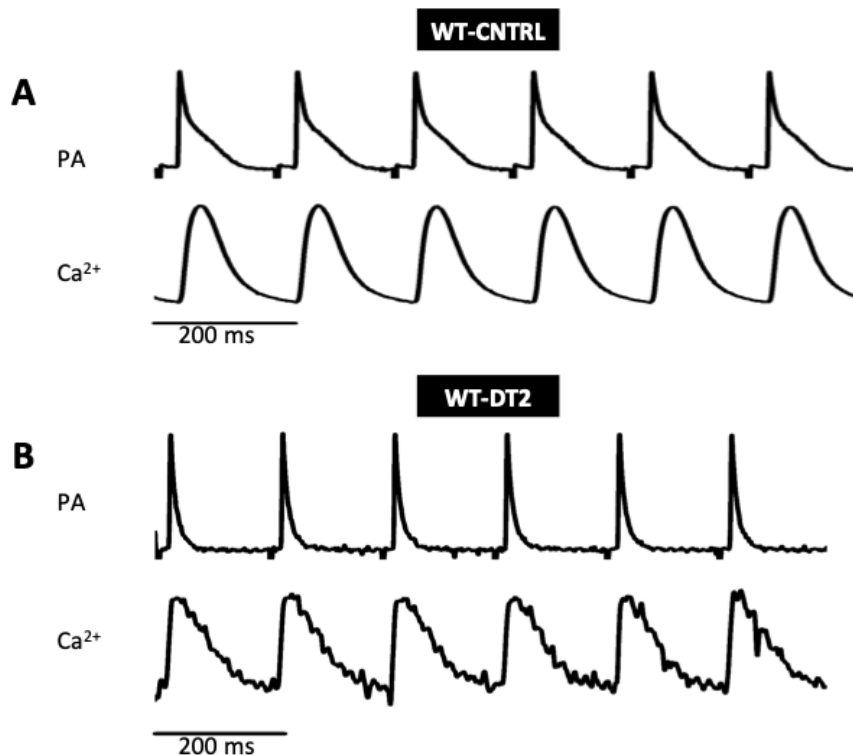


Figura 21: Traçados representativos de potencial de ação e transiente de cálcio no grupo (A) controle e (B) DT2 no átrio. PA: potencial de ação Ca²⁺: transiente de cálcio. Registros obtidos a 34 °C a frequência de estimulação de 6 Hz.

Já a **Fig. 22** mostra que a duração do PA atrial é mais curta nos animais DT2 que nos animais CNTRL, tanto à 30% (**Fig. 22A esquerda**) quanto à 90% (**Fig. 22A direita**) da repolarização.

Junto com estes eventos, fomos avaliar algumas propriedades do transiente de cálcio (**Fig. 22B**). Assim, observamos que os animais DT2 apresentam transientes mais rápidos no átrio, uma menor quantidade de Ca²⁺ sendo movimentado e aumento da velocidade de liberação e recaptção de Ca²⁺.

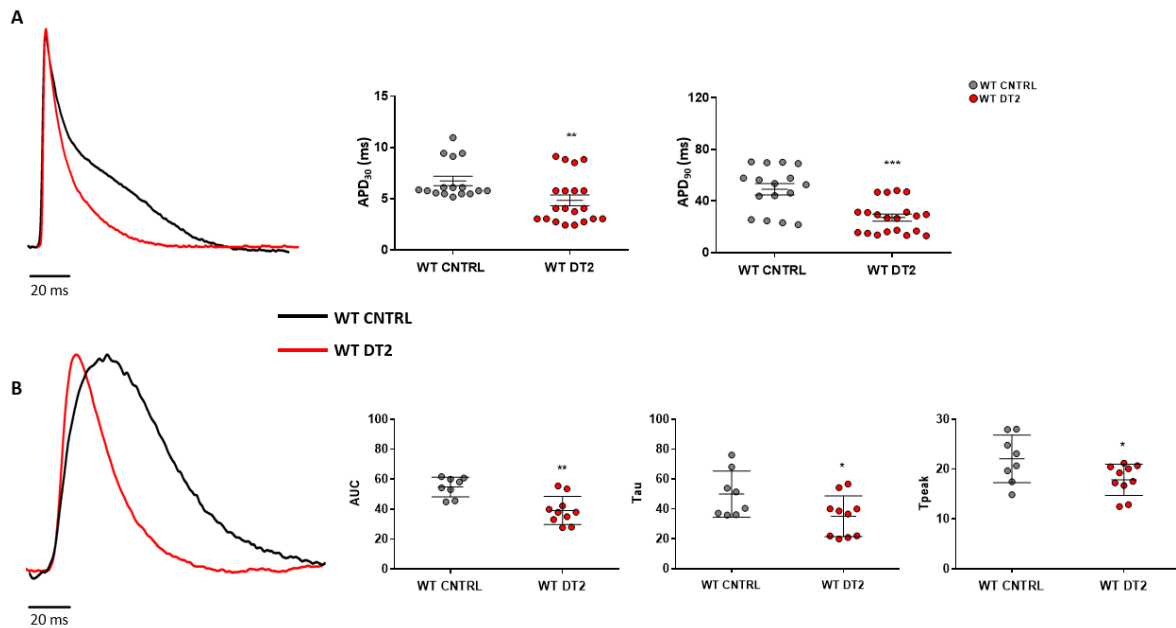


Figura 22: O DT2 diminui a duração do potencial de ação e o tempo de recaptção de cálcio no átrio. (A) Traçado representativo do PA atrial superimposto ao controle (CNTRL = preto) e DT2 (vermelho). Os gráficos da direita sintetizam os resultados obtidos. (B) Traçados representativos de transientes de cálcio (Ca²⁺) na situação controle (CNTRL = preto) e DT2 (vermelho). As figuras da direita sumarizam os resultados obtidos, mostrando que no DT2 todos os parâmetros mensurados foram menores que no grupo CNTRL. Registros obtidos a 34 °C a frequência de estimulação de 6 Hz. Resultados apresentados como média ± desvio padrão da média. *p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001.

Ainda, quando realizados protocolos específicos de estimulação utilizando S1-S2, foi observado que 3/5 animais DT2 mostraram eventos arrítmicos comparando com os animais CNTRL (1/4) (**Fig. 23**).

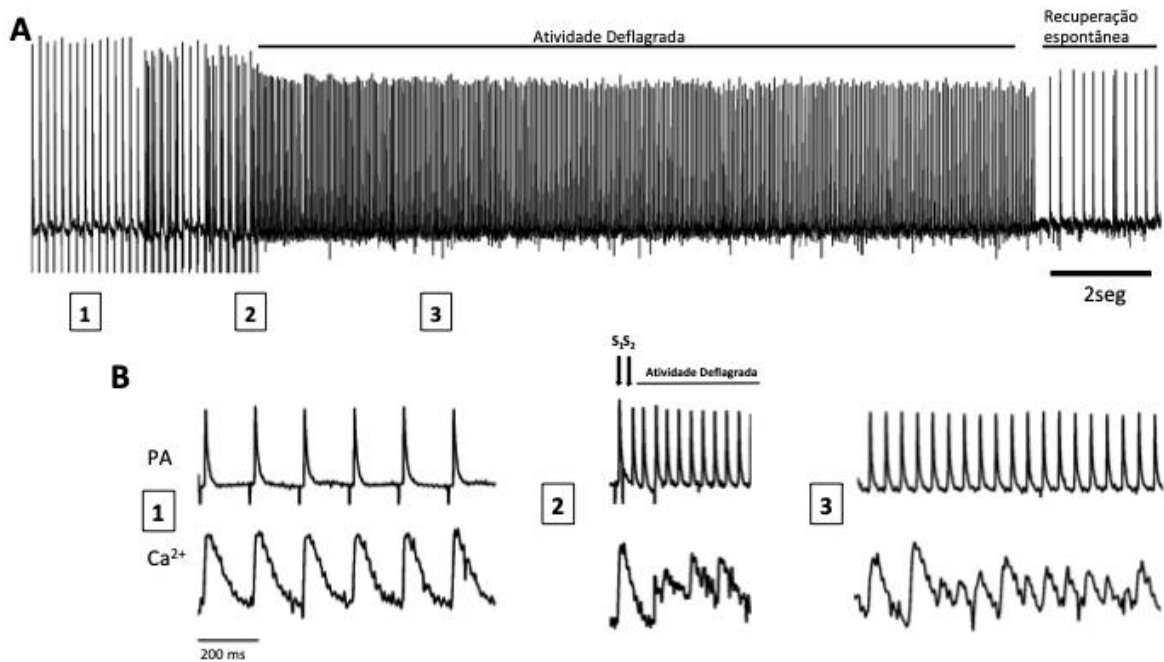


Figura 23: O DT2 produz aumento de eventos arritmicos atriais. (A) Traçado representativo de um registro de potencial de ação onde se observa que a aplicação de um segundo estímulo dispara atividade deflagrada a qual desaparece depois de um tempo voltando a condição inicial. (B) Traçados representativos de PA e Ca^{2+} em situação (1) inicial, (2) durante a aplicação do segundo estímulo onde se observa o início da atividade deflagrada, e (3) durante a atividade deflagrada.

5.6. ESTUDO DA FUNÇÃO VENTRICULAR.

Para avaliar os efeitos do DT2 sobre a função ventricular esquerda cardíaca, foi avaliada a mecânica ventricular mediante RMN nos animais WT CNTRL e WT DT2 (**Fig. 24**). Os animais diabéticos apresentaram uma disfunção ventricular esquerda evidenciada pela redução da fração de ejeção (**Fig. 24G**) a qual foi refletida também nos parâmetros da área do ventrículo esquerdo (**Figs. 24 C e D**), sendo significativamente maior no animais do grupo WT DT2 na sístole, no volume diastólico e sistólico final (**Figs. 24 E e F**), sendo este último maior nos animais WT DT2, e no débito sistólico (**Fig. 24H**).

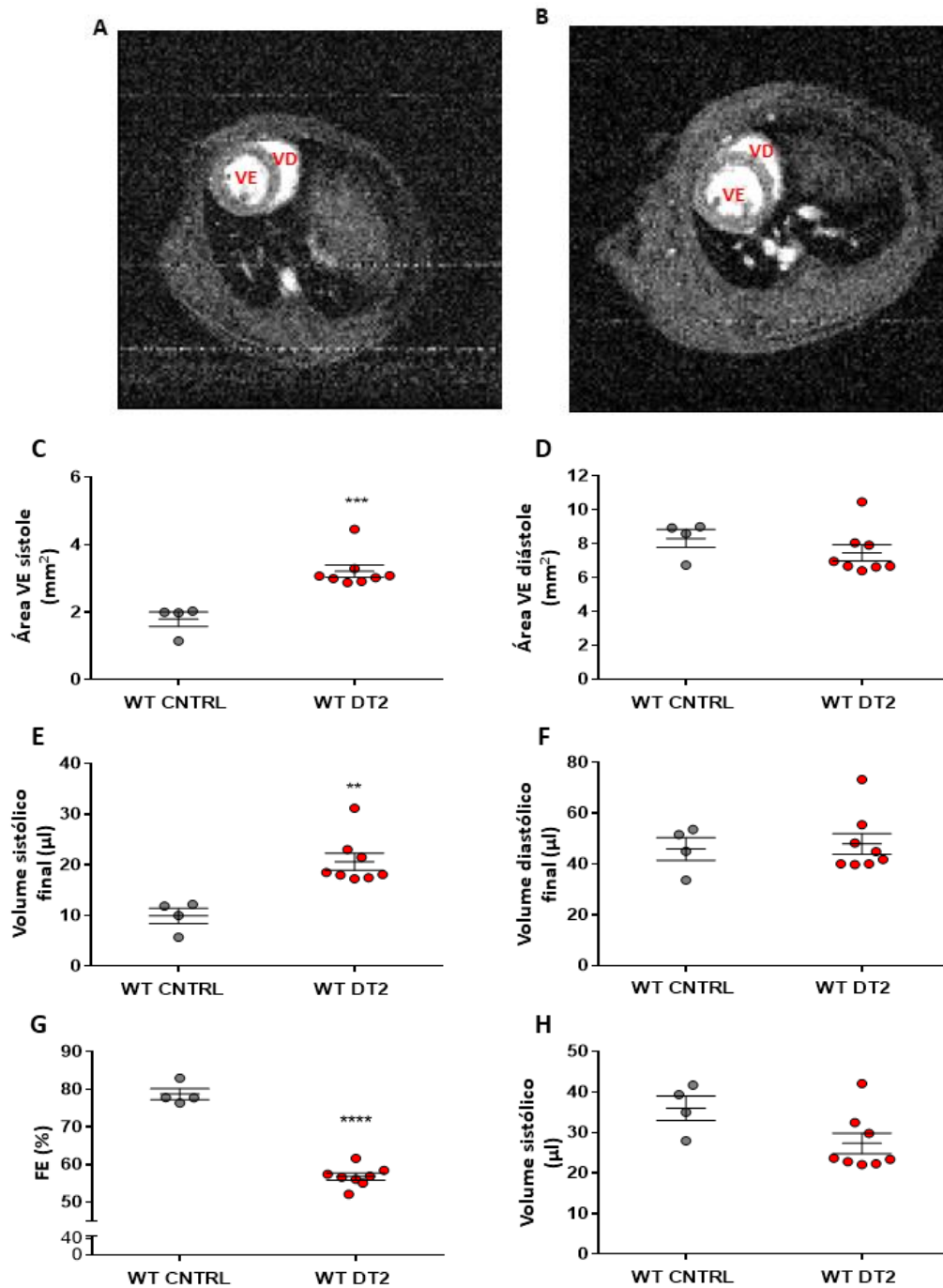


Figura 24: O DT2 produz uma disfunção ventricular sistólica. Imagens de seções transversais de corações dos camundongos do grupo WT CNTRL (A) e WT DT2 (B) adquiridas por RMN. Área do ventrículo esquerdo (VE) na sistole (C) e na diástole (D). Volume sistólico (E) e diastólico (F) final. (G) Fração de ejeção. (H) Débito sistólico. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

5.7. ESTUDO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO SUPORTADO PELOS DIFERENTES SUBSTRATOS DO SISTEMA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS (STE), MEDIDA DA PRODUÇÃO DE H₂O₂ E QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE.

Para avaliar o consumo de oxigênio mitocondrial nos diferentes estados respiratórios, foi utilizado um sistema de respirometria de alta resolução. Os resultados obtidos (**Fig. 25**) mostraram que o consumo de O₂ nos animais WT DT2 está diminuído, principalmente nos complexos I e II do STE (**Figs. 25 C e F**). Além disso, o vazamento inespecífico de prótons (do inglês *proton leak*) foi menor nos animais WT DT2 (**Fig. 25H**).

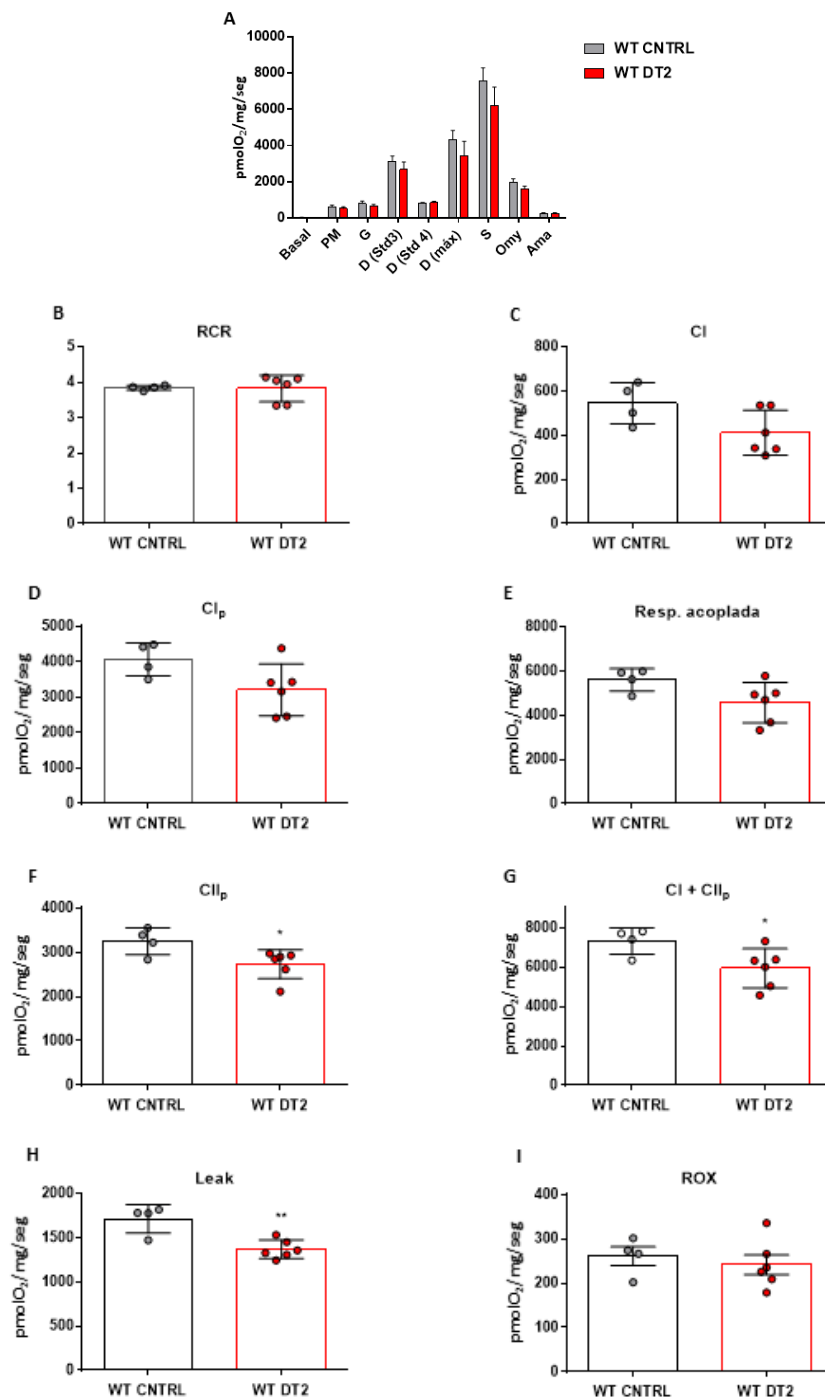


Figura 25: O DT2 diminui o consumo de O₂ pelos diferentes substratos do STE. (A) Perfil da respirometria de alta resolução com a utilização dos diferentes substratos do STE nos animais WT CNTRL e WT DT2. (B) Controle respiratório (*Respiratory Control Ratio*). (C) Consumo de oxigênio no estado não fosforilativo na presença de piruvato/malato. (D) Consumo de oxigênio no estado fosforilativo em presença de glutamato. (E) Consumo de oxigênio em presença de succinato. (F) Consumo de oxigênio na presença de piruvato/malato + succinato. (G) Consumo de oxigênio acoplado à síntese de ATP. (H) Vazamento inespecífico de prótons (*Proton Leak*). (I) Consumo de oxigênio residual (*ROX*). Os resultados são mostrados como média ± erro padrão da média. *p < 0,05; **p < 0,01.

A capacidade oxidativa de um tecido pode ser quantificada pelo conteúdo mitocondrial. Assim, mediante o estudo da atividade da citrato sintase (CS), o marcador mais comum do conteúdo mitocondrial, observamos que a atividade desta enzima está diminuída aproximadamente em 20% nos animais WT DT2 quando comparados com os WT CNTRL (Fig. 26A). Assim, quando normalizados os valores do consumo de O₂ pelos diferentes substratos do STE (Figs. 26 B e G), vemos que as diferenças observadas desaparecem, sugerindo que o efeito observado no consumo de O₂ é basicamente em função da redução do conteúdo mitocondrial.

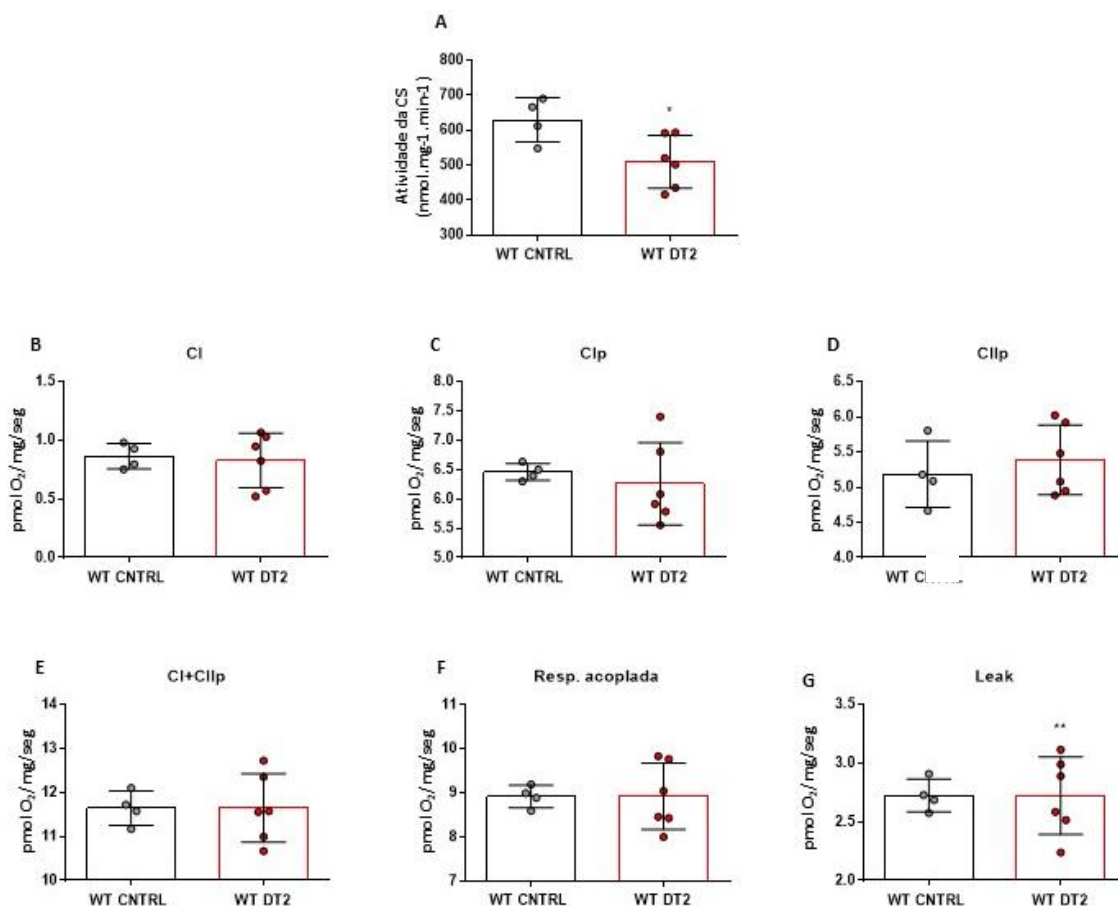


Figura 26: O DT2 diminui a atividade da citrato sintase (CS). (A) Quantificação da atividade CS nos animais WT CNTRL e WT DT2. (B) Consumo de oxigênio no estado no fosforilativo na presença de piruvato/malato normalizado pela atividade CS. (C) Consumo de oxigênio no estado fosforilativo em presença de glutamato normalizado pela atividade CS (D) Consumo de oxigênio em presença de succinato normalizado pela atividade CS (E) Consumo de oxigênio na presença de piruvato/malato + succinato normalizado pela atividade CS (F) Consumo de oxigênio acoplado à síntese de ATP normalizado pela atividade CS. (G) Vazamento inespecífico de prótons normalizado pela atividade CS. Os resultados são mostrados como média ± erro padrão da média. *p < 0,05; **p < 0,01.

Os processos oxidativos estão relacionados com a patogênese, progressão e complicações do DM. Assim, a hiperglicemia crônica e o subsequente aumento das EROs produzem uma deterioração das células β pancreáticas incrementando a resistência à insulina (KANETO et al., 2010). A principal fonte geradora de EROs são as mitocôndrias. Portanto, realizamos a análise da produção mitocondrial de H_2O_2 frente a adição de diferentes substratos, inibidores e desacopladores, o que possibilitou a avaliação deste escape de elétrons em diferentes estados de consumo de O_2 mitocondrial.

Na **Fig. 27A** podemos observar o perfil da produção de H_2O_2 utilizando diferentes substratos para o complexo I e II. Assim, não foi observado nenhuma diferença na produção de H_2O_2 nos animais WT DT2 quando comparados com os animais WT CNTRL (**Figs. 27 B e D**).

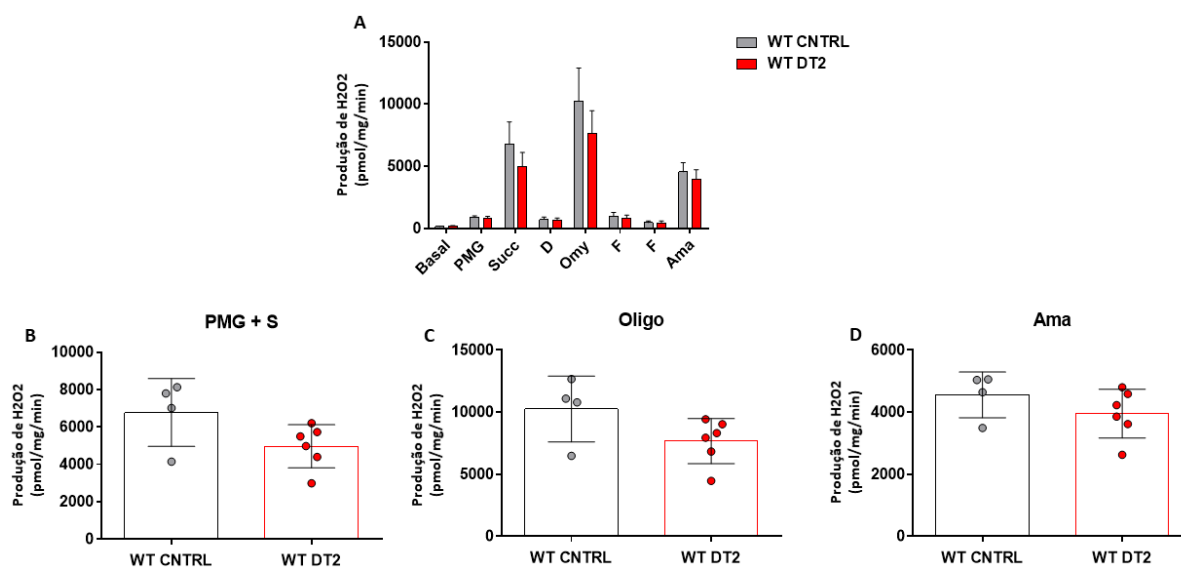


Figura 27: O DT2 diminui a produção de H_2O_2 nos diferentes substratos do STE. (A) Perfil da produção de H_2O_2 na presença dos diferentes substratos do STE. (B) Produção de H_2O_2 na presença de substrato para complexo I e II. (C) Produção de H_2O_2 em presença de oligomicina. (D) Produção de H_2O_2 em presença de antimicina A. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

5.8. PAPEL DO SISTEMA IMUNE INATO NO DT2.

Como descrito anteriormente, no DT1 existe um aumento da secreção de citocinas tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

Com o intuito de estudar como estavam os níveis dessas citocinas no nosso modelo de DT2, foi avaliada a concentração das mesmas nos soros dos animais WT CNTRL e WT DT2. Como observado na **Fig. 28**, houve um incremento das citocinas IL-1 β e IL-6 nos animais WT DT2 quando comparados com os animais WT CNTRL.

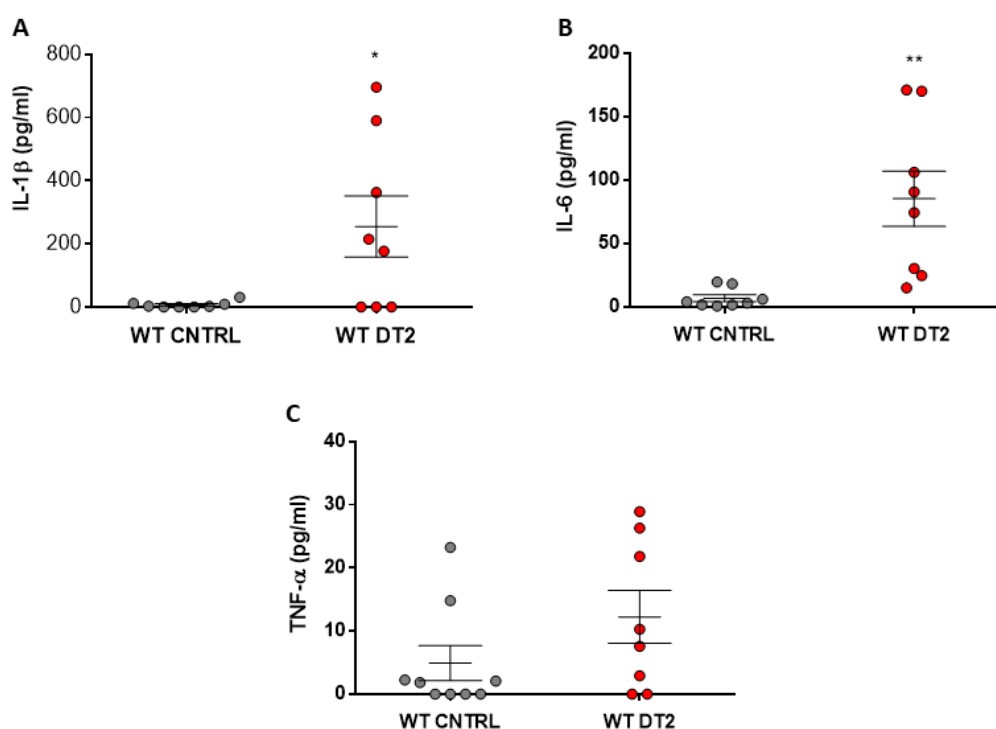


Figura 28: O DT2 aumenta a concentração de citocinas inflamatórias. Concentração de (A) IL-1 β , (B) IL-6 e (C) TNF- α no soro dos animais WT CNTRL e WT DT2 após 6 semanas de tratamento. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Monnerat & L. Alarcón mostraram que no DT1 a ativação do TLR2 e inflamossoma NLRP3 intercede na produção de IL-1 β e que a produção dessa citocina produz um prolongamento da duração do PA, diminuição da densidade da corrente I_{to} e aumento na liberação espontânea de cálcio (*calcium sparks*) nos miócitos cardíacos. Essas alterações estão associadas a um aumento da susceptibilidade a desenvolver arritmias cardíacas. Assim os autores também mostraram que essas arritmias

observadas no modelo murino de DT1 podem ser tratadas inibindo o eixo IL-1 β , mostrando assim, que a IL-1 β é o nexo de união entre a disfunção metabólica e os eventos arrítmicos no DT1 (MONNERAT et al., 2016).

Por outro lado, Lee e colaboradores mostraram que os macrófagos obtidos de pacientes com DT2 apresentam um aumento na expressão basal de NLRP3 e ASC e um aumento também na maturação e secreção de IL-1 β (LEE et al., 2013).

Com essas informações, avaliamos no presente projeto qual o papel do eixo NLRP3/CASP1/IL-1 β nos acometimentos elétricos cardíacos induzidos no modelo de DT2 aqui utilizado. Para avaliar este eixo foram utilizados camundongos *knock-out* (KO) para NLRP3 ou CASP1 ou IL-1R.

Para isso, camundongos KO no background C57bl/6 para NLRP3 (NLRP3^{-/-}), CASP1 (CASP1^{-/-}), e IL1R (e IL1R^{-/-}) machos de 2 meses de idade foram divididos em 2 grupos: controle (CNTRL) e diabéticos (DT2). O desenho experimental para indução do DT2 foi o mesmo utilizado com os camundongos selvagens (WT DT2): 2 semanas após do início da dieta (dieta padrão para os animais KO CNTRL e HFD para os animais KO DT2), os animais do grupo DT2 dos respectivos grupos KO (NLRP3^{-/-}, CASP1^{-/-}, e IL1R^{-/-}) receberam 2 injeções de STZ (40 mg/kg) separadas 24 horas uma da outra. 4 semanas após a injeção, foram realizados os estudos metabólicos, bioquímicos e eletrocardiográficos pertinentes.

Assim, todos os animais KO DT2, não apresentaram um aumento do peso corporal quando comparados com os animais KO controle (CNTRL) (**Fig. 29A**). Em todos grupos KO DT2 estudados foi possível induzir um aumento sustentado da glicemia (**Fig. 29B**) e esses níveis de glicose foram semelhantes aos observados nos animais DT2 selvagens (linha ponteadada).

Por outro lado, quando realizados o IPGTT (**Figs. 29 C e D**) e IPITT (**Figs. 29 E e F**), todos os grupos KO DT2 mostraram um aumento na concentração de glicose após 15, 30, 60 e 120 minutos da administração de glicose (**Fig. 29C**) e insulina (**Fig. 29E**) exógena. Esses resultados indicados como a medição da área embaixo da curva (AUC)

foram maiores nos animais KO DT2 mostrando que esses animais apresentam dificuldade para captar a glicose corretamente e que isso é devido a uma resistência à insulina como mostrada no gráfico do IPITT.

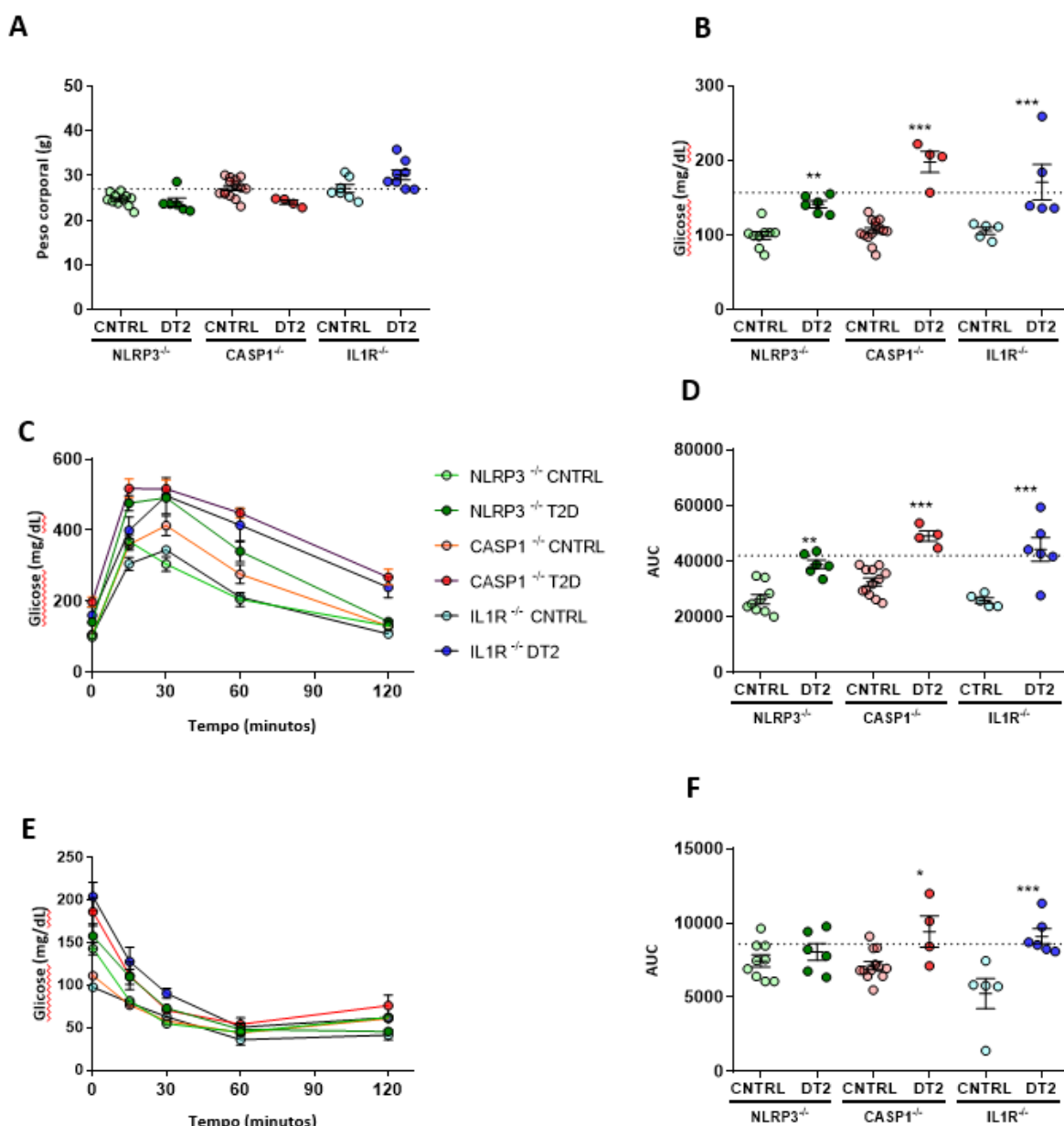


Figura 29: A combinação da HFD e baixa dose de STZ induz DT2 em ausência de NLRP3, CASP1 e IL1R. (A) Peso corporal dos grupos experimentais após 6 semanas de tratamento. (B) Concentração de glicose no sangue. (C) IPGTT e (E) IPITT mostrando os níveis de glicose no sangue após 15, 30, 60 e 120 minutos da injeção de glicose e insulina respectivamente. (D e F) AUC dos correspondentes testes de IPGTT e IPITT respectivamente. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparando o respectivo grupo KO DT2 com seu controle.

Em conjunto, esses resultados do aumento da glicemia e resistência à insulina mostram que nos animais KO foi possível reproduzir o estado metabólico do DT2 observado nos animais selvagens quando combinado uma HFD e baixa dose de STZ.

5.9. AVALIAÇÃO DO PAPEL DO EIXO NLRP3/CASP1/IL-1 β NA ATIVIDADE ELÉTRICA NO DT2

Uma vez definido o perfil metabólico dos animais KO, avaliamos se a falta das moléculas chave do eixo NLRP3/CASP1/IL-1 β poderia melhorar o perfil elétrico cardíaco e as alterações observadas nos animais WT DT2 (**Fig. 30**). Para isso, similar ao que foi feito com os animais selvagens, foi realizado o ECG *in vivo* (**Figs. 30 A e C**) e foi estudada a vulnerabilidade para desenvolver arritmias cardíacas mediante o protocolo que combina uma dose intraperitoneal de cafeína (120 mg/kg) e uma dose intravenosa de dobutamina (50 μ g/kg) (**Figs. 30 D e E**).

Assim, foi observado em todos os grupos KO DT2, um aumento no intervalo QJ (**Fig. 30C**) com valores semelhantes aos observados nos animais selvagens (linha ponteadada) e não houve diferenças na frequência cardíaca (representada pelo intervalo RR, como mostrado na **Fig. 30B**). Porém, os animais IL1R^{-/-} mostraram um aumento no intervalo RR por diminuir a frequência cardíaca.

Por outro lado, quando realizado o teste de vulnerabilidade a arritmias cardíacas (**Figs. 30 D e E**), foi observado que os animais NLRP3^{-/-} DT2 e CASP1^{-/-} DT2 mostraram maior quantidade de eventos arrítmicos quando comparados com seus respectivos controles. Porém, a severidade e quantidade desses eventos é menor que o observado nos animais WT DT2.

Esses resultados em conjunto mostram que, diferente do que acontece no DT1, no DT2 a supressão dessas moléculas da via do IL-1 β não é capaz de reverter as alterações elétricas, sugerindo que sejam outras moléculas as que estão envolvidas nessas alterações.

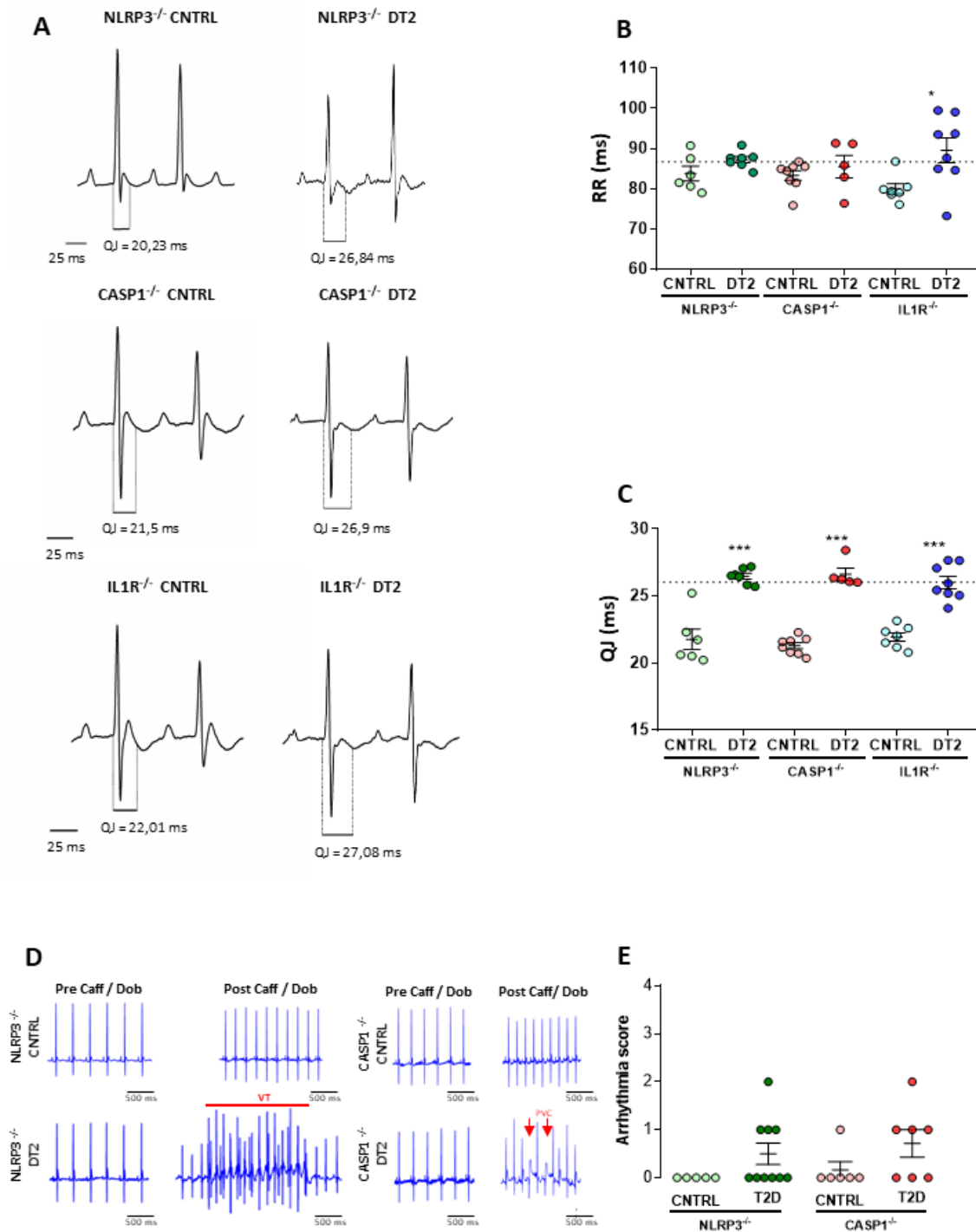


Figura 30: NLRP3, CASP1 e IL1R não interferem no remodelamento elétrico no DT2. (A) Traçados representativos do ECG dos animais CNTRL e DT2 dos animais NLRP3^{-/-}, CASP1^{-/-} e IL1R^{-/-}. (B) Gráfico da duração do intervalo RR e (C) do intervalo QJ de todos os grupos experimentais. (D) Registro de ECG antes e depois da injeção de cafeína (120 mg/kg) e dobutamina (50 µg/kg) dos animais NLRP3^{-/-} (esquerda) e CASP1^{-/-} (direita). (E) Gráfico da quantificação dos eventos arrítmicos em função da severidade seguindo a seguinte pontuação (score): 1 extrasístole (PVC); 2 bigeminismo; 3 taquicardia ventricular (VT) e 4 fibrilação ventricular. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. *p < 0,05; ***p < 0,001 comparando o respectivo grupo KO DT2 com seu controle.

Finalmente, fomos avaliar os efeitos da supressão da molécula NLRP3 sobre a função na mecânica cardíaca mediante a RMN (**Fig. 31**) observando disfunção cardíaca evidenciada pela redução da fração de ejeção (**Fig. 31F**), assim como uma redução na área do ventrículo esquerdo tanto na sístole quanto na diástole (**Figs. 31 B e C**), um aumento no volume sistólico (**Fig. 31D**) e diminuição do débito cardíaco (**Fig. 31G**). Esse resultado demonstra que pelo menos a via do inflamossoma NLRP3 parece não estar envolvida nas alterações mecânicas observadas no DT2.

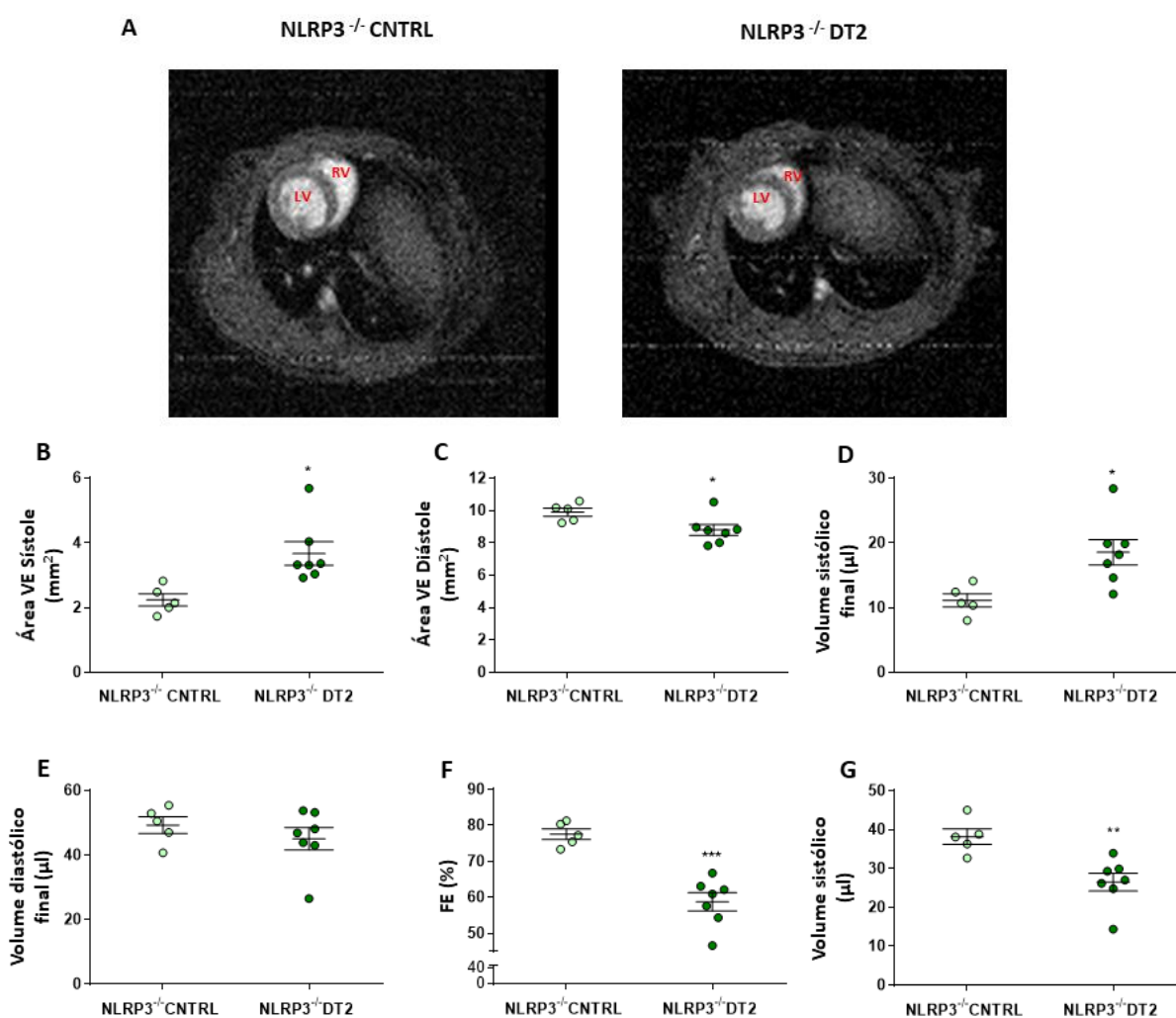


Figura 31: A supressão da molécula NLRP3 não melhora a função mecânica nos animais DT2. (A) Imagens de seções transversais de corações dos camundongos do grupo NLRP3^{-/-} CNTRL (esquerda) e NLRP3^{-/-} DT2 (direita) adquiridas por RMN. (B) Área do ventrículo esquerdo (VE) na sístole (C) e na diástole. (D) Volume sistólico (E) e diastólico final. (F) Fração de ejeção. (G) Débito sistólico. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

6. DISCUSSÃO

O diabetes mellitus tipo 2 (DT2) é o distúrbio metabólico mais comum cuja prevalência a nível mundial está em contínuo aumento. Esta síndrome é associada a complicações a longo prazo que resultam em complicações cardiovasculares associadas com aumento da incidência de desenvolver arritmias podendo levar a morte.

Existem vários modelos animais de DT2 que permitem o estudo desta síndrome. Assim, existem modelos genéticos, como os ratos Zucker ou os camundongos db/db, que desenvolvem DT2 espontaneamente (BOLAND et al., 2018; MARTINEZ et al., 2018), e também, existem modelos induzidos com fármacos ou determinados nutrientes, como os modelos induzidos com aloxano, com STZ ou os modelos induzidos com frutose (SADEGHI et al., 2017; VATTAM et al., 2016). Porém, esses modelos não conseguem mimetizar completamente as manifestações clínicas observadas no paciente.

Ainda que mais de 90% dos pacientes diabéticos apresentem DT2, a maioria dos trabalhos experimentais em eletrofisiologia foram realizados em modelos animais de DT1. Por isso, nós objetivamos desenvolver um modelo experimental de DT2 que imite a história natural desta síndrome em humano para estudar as características tanto elétricas quanto mecânicas e metabólicas desta síndrome.

Neste contexto, na última década foi desenvolvido um modelo animal que combina uma dieta hiperlipídica junto com administração de STZ, a qual acarreta o desenvolvimento da síndrome metabólica, inicialmente com destruição parcial das células β pancreáticas depois, levando a uma situação de resistência à insulina (REED et al., 2000). Essa combinação consegue reproduzir a situação de DT2 observada no paciente, principalmente a glicemia elevada (embora menor que no DT1), hiperlipidemia e a resistência à insulina (TI et al., 2011).

Com o objetivo de estudar as alterações tanto elétricas quanto mecânicas e metabólicas observadas nos pacientes com DT2, nesta tese utilizamos esse modelo animal descrito por Reed e colaboradores, porém modificado dado que quando fomos reproduzir esse modelo com uma única dose de STZ, o número de animais diabéticos

era menor do 50%. Por isso, foram administradas 2 doses de STZ de 40 mg/kg de animal separadas 24 horas uma da outra como descrito por Gilbert e colaboradores (GILBERT; FU; LIU, 2011).

Após 6 semanas de tratamento, os resultados mostraram que os animais alimentados com uma HFD e que receberam 2 doses de STZ (animais do grupo WT DT2), mostraram aumento do peso corporal, decorrente de um aumento da gordura total, porém esse aumento não foi tão exacerbado quanto ao observado em modelos obesos como db/db ou Zucker. Também foram observadas alterações nos parâmetros bioquímicos, como aumento dos níveis de glicose no sangue. Além disso, quando realizados os testes de tolerância à glicose e insulina, IPGTT e IPITT respectivamente, junto com a análise do índice HOMA, os resultados mostraram que esses animais apresentavam resistência à insulina. Essa característica, junto com o aumento da glicose sanguínea definem o DT2, confirmando que nosso modelo conseguiu reproduzir a situação diabética do DT2 em humanos.

Sabendo que o DT2 pode levar a alterações da função renal e que existe uma estreita relação entre essas alterações e as alterações cardíacas, fomos avaliar a função renal no modelo aqui estudado. Não observamos alterações no que diz respeito a morfologia renal e também não observamos alterações na concentração sérica de ureia o que nos sugere uma correta função renal. Porém, as alterações na função renal acontecem em idades avançadas tal e como mostraram Wu e colaboradores (2010) em um modelo murino de DT2 (WU et al., 2010), o qual pode sugerir que o modelo aqui descrito no apresenta o estágio crônico de DT2.

Uma vez estabelecido o modelo de DT2, estudamos as alterações elétricas, mecânicas e metabólicas cardíacas nos mesmos. Assim, os animais WT DT2 com 6 semanas de diabetes apresentaram alterações elétricas cardíacas observadas no ECG, associadas à repolarização ventricular observando-se um prolongamento do intervalo QJ. Esse intervalo representa a repolarização ventricular precoce.

Nos grandes mamíferos como os humanos, a onda T representa a diferença da repolarização entre o epicárdio e o endocárdio. Em contrapartida, nos camundongos a onda T representa a diferença da repolarização entre o ápice e a base, e a diferença da repolarização entre o epicárdio e o endocárdio é representada pela onda J (EMORI; ANTZELEVITCH, 2001).

Previamente, no ano de 1996, Yan e Antzelevitch definiram a onda J como uma deflexão que aparece no ECG como uma onda delta tardia após o complexo QRS. Ela reflete a repolarização rápida durante a fase 1 do potencial de ação (PA) e está associada ao desenvolvimento de uma pronunciada dispersão da repolarização ventricular dando lugar ao desenvolvimento de arritmias cardíacas (YAN; ANTZELEVITCH, 1996).

Acompanhando esses dados, no nosso modelo de DT2 observamos um aumento no intervalo QJ quando comparados com os animais WT CNTRL, um aumento na duração do PA ventricular à 90% da repolarização, e uma diminuição da densidade da corrente Ito, principal corrente repolarizante responsável pela duração do PA, pelo menos nos camundongos.

Junttila e colaboradores (2014) já mostraram que alterações na repolarização precoce predizem eventos arrítmicos principalmente taquicardias ventriculares (JUNTILA et al., 2014). Nossos resultados obtidos com o protocolo de arritmias, que combina a dose de cafeína intraperitoneal com a dose intravenosa de dobutamina, acompanha essa afirmação, já que os animais WT DT2 apresentaram maior quantidade de eventos arrítmicos que os animais WT CNTRL, e de maior severidade, principalmente ocorrendo taquicardias ventriculares. Além disso, quando estimulados *ex vivo* mediante um protocolo específico de estimulação utilizando S1-S2, esse resultado é confirmado.

Além dos distúrbios classicamente descritos no ventrículo, já está bem documentado que os pacientes diabéticos têm maior incidência de fibrilação atrial (FA) (BELL; GONCALVES, 2018; SENSI et al., 2018; TADIC; CUSPIDI, 2015). Já foi descrito na literatura a relação entre a FA e o DT2 sendo que aproximadamente 40% dos pacientes

diabéticos apresentam maior risco de FA que os pacientes não diabéticos, tal como descrito por Huxley e colaboradores (HUXLEY et al., 2011). Ainda, o DT2 é associado com alterações não só ventriculares mas também atriais (AGARWAL; SINGH, 2017; CHOW et al., 2014; DEMIR et al., 2016) o que foi refletido em nosso modelo experimental do DT2.

Diante disto, é necessário estudar as propriedades elétricas atriais neste novo modelo de DT2 aqui proposto. Assim, utilizando a técnica previamente descrita por Escobar e colaboradores (2014) de registro de PA de coração inteiro, igual ao realizado nos ventrículos, realizamos análises dos PA atriais estudando simultaneamente a vulnerabilidade desses corações para desenvolver arritmias atriais mediante protocolos de estimulação elétrica.

Por outro lado, os eventos celulares relacionados com o acoplamento excitação-contracção podem ser avaliados simultaneamente aos eventos elétricos em coração inteiro, mediante o uso de sondas moleculares como o Rhod-2 AM, que permitem monitorar o Ca^{2+} intracelular (AGUILAR-SANCHEZ et al., 2017). Esta técnica que avalia propriedades cardíacas a nível de órgão intacto em condições fisiológicas próximas à condição *in vivo*, é a mais adequada para estudar as alterações no acoplamento excitação-contracção cardíaco que definem o comportamento do tecido. Assim, esta técnica nos permitiu avaliar a cinética intracelular do Ca^{2+} em nosso modelo de DT2 no qual observamos que o Ca^{2+} demora menos tempo em ser retirado do citoplasma o que pode levar a maior suscetibilidade a desenvolver arritmias cardíacas, principalmente FA.

O DT2, também, é associado com doença arterial coronariana e é um fator de risco para desenvolver infarto do miocárdio. A disfunção ventricular e a hipertrofia cardíaca são muito comuns nos pacientes com DT2 (ERNANDE et al., 2011; JØRGENSEN et al., 2016).

Com esses antecedentes, além de estudar as alterações elétricas cardíacas nós objetivamos estudar as alterações mecânicas produzidas pelo DT2 no coração. Os resultados obtidos mostraram que em nosso modelo de DT2 houve uma disfunção cardíaca evidenciada principalmente pela redução da fração de ejeção. Os resultados

aqui obtidos mostraram uma disfunção predominantemente sistólica. Geralmente é bem descrito e aceito que nos pacientes DT2 o que prepondera é uma disfunção diastólica (OE et al., 2015; SAKAMOTO; MATSUTANI; KAYAMA, 2018). Neste sentido, o presente modelo parece não representar as alterações mecânicas características desta doença. Entretanto, alguns autores mostraram que na fase final da doença pode aparecer disfunção ventricular sistólica (MACDONALD et al., 2008; ZOPPINI et al., 2017). Assim, podemos interpretar que o presente modelo nos pode ajudar para entender os mecanismos de remodelamento mecânico em um estágio mais tardio da doença.

O dano oxidativo apresenta-se quando existe um aumento das moléculas oxidantes, tanto endógenas quanto exógenas, ou quando existe uma diminuição das defesas antioxidantes. As doenças metabólicas como o DT2 têm grandes possibilidades de apresentar uma participação de elementos oxidativos na sua gênese, evolução ou complicações alterando os mecanismos antioxidantes (GOLBIDI; ALIREZA EBADI; LAHER, 2011).

Neste contexto, nossos dados mostraram que o DT2 em nosso modelo animal produz uma redução no conteúdo mitocondrial, avaliado através da atividade da citrato sintase, sem, contudo, afetar a produção de H_2O_2 o que pode explicar a diminuição do consumo de O_2 observada nesses animais. Por outro lado, o menor vazamento de prótons observado poderia indicar uma menor capacidade de adaptação ao estresse oxidativo. Acompanhando nossos resultados, Feng e colaboradores (2018) mostraram que tanto num modelo de DT1 quanto do DT2, que existe um aumento do estresse oxidativo e que suprimindo uma quinase do controle geral de nutrientes, GCN2, além de melhorar a resistência à insulina, existiria uma melhora da disfunção cardíaca devido a diminuição da apoptose dos cardiomiócitos e estresse oxidativo nos mesmos, relacionando assim as alterações cardíacas observadas com os mecanismos antioxidantes (FENG et al., 2018).

A hiperglicemia não controlada pode contribuir para a suscetibilidade a infecção e inflamação refletida no aumento da concentração de citocinas pro-inflamatórias (SAUKKONEN et al., 2018). Assim, acompanhando esses achados, nossos resultados

mostraram que no modelo de DT2 existe um aumento das mesmas, principalmente IL-1 β e IL-6.

Sabendo que no nosso modelo de DT2 existe um aumento da produção de IL-1 β e baseado no estudo de Monnerat & L. Alarcón (2016) sobre o papel do sistema imune no DT1 (MONNERAT et al., 2016), avaliamos neste modelo de DT2 se a falta das moléculas do eixo de IL-1 β como NLRP3, CASP1 e IL1R, os acometimentos cardíacos observados poderiam ser prevenidos.

Os resultados obtidos mostraram que a ausência de NLRP3, CASP1 ou IL1R não preveniu as alterações elétricas nem mecânicas. Estes dados nos levam a pensar que, diferente do observado por nosso grupo no modelo de DT1, neste modelo de DT2 o eixo NLRP3/CASP1/IL-1 β parece não estar envolvido nos acometimentos cardíacos aqui estudados. Acompanhando isso, um estudo recente publicado por nosso grupo, mostrou que este eixo aqui estudado não estava envolvido nos acometimentos cardíacos induzidos pela sepse grave onde existe um incremento na concentração de IL-1 β (ALARCÓN et al., 2017). Outros autores como Heymans e colaboradores (2009) mostraram que a inibição de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-18 ou TNF- α , não conseguiram reverter essas alterações, e em alguns casos até exacerbaram a insuficiência cardíaca (HEYMANS et al., 2009). Porém, Yao e colaboradores recentemente publicaram que a supressão genética do NLRP3 consegue prevenir o desenvolvimento de FA num modelo bem estabelecido de FA espontânea (YAO et al., 2018).

Contudo, podemos propor que: (i) no modelo de DT2 aqui descrito, as citocinas estudadas não tem um papel chave, pelo menos no que diz respeito aos parâmetros avaliados e (ii) que este modelo de DT2 reflete um estágio avançado desta síndrome no qual essas alterações poderiam estar produzidas por outras citocinas não estudadas aqui.

Neste contexto, Amit e colaboradores (2017) descreveram o papel do receptor 1 α da interleucina-13 na homeostase miocárdica e insuficiência cardíaca (AMIT et al.,

2017). Esses autores mostraram que a IL-13R α 1 está ligada a vias associadas com a deposição da matriz extracelular e o metabolismo da glicose. Assim, a deficiência desse receptor piora o desfecho com aumento na disfunção do ventrículo esquerdo. Isso está associado com deficiências na deposição da matriz extracelular miocárdica e com metabolismo anormal da glicose abrindo a possibilidade de estudar o papel desse receptor nas alterações observadas no modelo de DT2 aqui descrito.

Contudo, o presente trabalho apresenta um modelo experimental de DT2 que consegue reproduzir as alterações elétricas, mecânicas e metabólicas observadas nos pacientes diabéticos, constituindo uma boa ferramenta para estudar diversos aspectos da mesma e realizar estudos pré-clínicos relevantes.

7. CONCLUSÕES

- ✓ O protocolo aqui utilizado foi capaz de reproduzir um modelo de DT2;
- ✓ O aumento do intervalo QJ e da duração do PA à 90% da repolarização observado nos animais DT2 pode ser explicado, pelo menos em parte, pela diminuição da corrente Ito;
- ✓ Os animais DT2 mostraram maior susceptibilidade a arritmias cardíacas tanto atriais quanto ventriculares;
- ✓ As propriedades cinéticas do manejo do cálcio estão alteradas no DT2 sendo que:
i. no ventrículo o Ca^{2+} é recaptado mais rápido do citoplasma (menor tau) e ii. No átrio observamos que existe uma menor movimentação de Ca^{2+} ;
- ✓ A função ventricular esquerda sistólica nos animais DT2 está comprometida, observando-se também menor % FE;
- ✓ Os animais DT2 mostraram uma redução no conteúdo mitocondrial;
- ✓ A falta de moléculas chave para o sistema imune inato, tal como NLRP3, CASP1 ou IL-1R, não interferiu na indução de DT2;
- ✓ O sistema imune inato, pelo menos a via do inflamossoma NLRP3, parece não estar envolvida nas alterações elétricas cardíacas aqui observadas.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como observado na presente tese de doutorado, não fomos capazes de finalizar todos os estudos referentes ao papel do eixo NLRP3/CASP1/IL-1R, sendo assim, nos propomos continuar investigando e aprofundando os conhecimentos neste sentido.

Ainda, a presente tese faz parte, também, de projeto colaborativo entre UFRJ-UFPE-UFABC no marco do Projeto CAPES-PROCAD-2013. Sendo assim, tendo consolidado o modelo de DT2 almejamos em breve começar a testar o potencial hipoglicemiante da WSMoL, lectina purificada da *Moringa oleifera*, em dito modelo. Vale ressaltar que já foi realizada a caracterização cardíaca desta lectina, que mostrou não ter efeitos tóxicos para o coração.

9. REFERENCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, 2012.

ADAMCZAK, D. The Role of Toll-Like Receptors and Vitamin D in Cardiovascular Diseases—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 11, p. 2252-2275, 2017.

ADELMAN, W. J.; SENFT, J. P. Voltage clamp studies on the effect of internal cesium ion on sodium and potassium currents in the squid giant axon. *The Journal of General Physiology*, v. 50, n. 2, p. 279–293, 1966.

AFANASYEVA, M.; GEORGAKOPOULOS, D.; BELARDI, D.F.; RASMUNDAR, A.C.; BARIN, J.G.; KASS, D.A.; ROSE, N.R. Quantitative analysis of myocardial inflammation by flow cytometry in murine autoimmune myocarditis: correlation with cardiac function. *The American Journal of Pathology*, v. 164, n. 3, p. 807–815, 2004.

AFFOURTIT, C.; QUINLAN, C. L.; BRAND, M. D. Measurement of proton leak and electron leak in isolated mitochondria. *Methods in Molecular Biology*, v. 810, p. 165–182, 2012.

AGARWAL, G.; SINGH, S. Arrhythmias in type 2 diabetes mellitus. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, v. 21, n. 5, p. 715-718, 2017.

AGUILAR-SANCHEZ, Y.; FAINSTEIN, D.; MEJÍA-ALVAREZ, R.; ESCOBAR, A. L. Local Field Fluorescence Microscopy: Imaging Cellular Signals in Intact Hearts. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n. 121, 2017.

AHMED, A. M. History of diabetes mellitus. *Saudi Medical Journal*, v. 23, n. 4, p. 373–378, 2002.

ALAM, U.; ASGHAR, O.; AZMI, S.; MALIK, R. A. General aspects of diabetes mellitus. *Handbook of Clinical Neurology*. v. 126, p. 211–222, 2014.

ALARCÓN, M. M. L.; RUOCCO, J. F.; FERREIRA, F.; PAULA-NETO, H. A.; SEPÚLVEDA, M.; PETROFF, M. V.; et al. TLR4 and NLRP3 Caspase 1- IL-1 β - Axis are not Involved in Colon Ascendens Stent Peritonitis (Casp)-Associated Heart Disease. *Shock*, v. 50, n. 4, p. 483-492, 2017.

ALBERSEN, M.; LIN, G.; FANDEL, T. M.; ZHANG, H.; QIU, X.; LIN, C. S.; LUE, T. F. Functional, metabolic, and morphologic characteristics of a novel rat model of type 2 diabetes-associated erectile dysfunction. *Urology*, v. 78, n. 2, p. 476.e1–8, 2011.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, v. 38 Suppl, p. S8–S16, 2015.

AMIT, U.; KAIN, D.; WAGNER, A.; SAHU, A.; NEVO-CASPI, Y.; GONEN, N.; et al. New Role for Interleukin-13 Receptor α 1 in Myocardial Homeostasis and Heart Failure. *Journal of the American Heart Association*, v. 6, n. 5, p. e005108, 2017.

BELL, D. S. H.; GONCALVES, E. Atrial fibrillation and type 2 diabetes: Prevalence, etiology, pathophysiology and effect of anti-diabetic therapies. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2018.

BENNETT, D. S. Depression among children with chronic medical problems: a meta-analysis. *Journal of Pediatric Psychology*, v. 19, n. 2, p. 149–169, 1994.

BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, v. 415, n. 6868, p. 198–205, 2002.

BOLAND, B. B.; BROWN, C. Jr.; BOLAND, M. L.; CANN, J.; SULIKOWSKI, M.; HANSEN, G. et al. Pancreatic β -Cell Rest Replenishes Insulin Secretory Capacity and Attenuates Diabetes in an Extreme Model of Obese Type 2 Diabetes. *Diabetes*, p. db180304, 2018.

BRUGADA, P.; BRUGADA, J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 20, n. 6, p. 1391–1396, 1992.

BRYDER, L.; HARPER, C. Commentary: more than “tentative opinions”: Harry Himsworth and defining diabetes. *International Journal of Epidemiology*, v. 42, n. 6, p. 1599–1600, 2013.

BUNNER, A. E.; CHANDRASEKERA, P. C.; BARNARD, N. D. Knockout mouse models of insulin signaling: Relevance past and future. *World Journal of Diabetes*, v. 5, n. 2, p. 146–159, 2014.

CANCELLO, R.; CLÉMENT, K. Review article: Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, v. 113, n. 10, p. 1141–1147, 2006.

CASIS, O.; GALLEGO, M.; IRIARTE, M.; SÁNCHEZ-CHAPULA, J. A. Effects of diabetic cardiomyopathy on regional electrophysiologic characteristics of rat ventricle. *Diabetologia*, v. 43, n. 1, p. 101–109, 2000.

CASIS, O.; ECHEVARRIA, E. Diabetic cardiomyopathy: electromechanical cellular alterations. *Current Vascular Pharmacology*, v. 2, n. 3, p. 237–248, 2004.

CHATZIGEORGIU, A.; HALAPAS, A.; KALAFATAKIS, K.; KAMPER, E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo*, v. 23, n. 2, p. 245–258, 2009.

CHOW, E.; BERNJAK, A.; WILLIAMS, S.; FAWDRAY, R. A.; HIBBERT, S.; FREEMAN, J.; SHERIDAN, P. J.; HELLER, S. R. Risk of Cardiac Arrhythmias During Hypoglycemia in

Patients with Type 2 Diabetes and Cardiovascular Risk. *Diabetes*, v. 63, n. 5, p. 1738–1747, 2014.

CURTIS, M. J.; WALKER, M. J. Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an in vivo model of regional myocardial ischaemia. *Cardiovascular Research*, v. 22, n. 9, p. 656–665, 1988.

DEMIR, K.; AVCI, A.; KAYA, Z.; MARAKOGLU, K.; CEYLAN, E.; YLMAZ, A.; et al. Assessment of atrial electromechanical delay and P-wave dispersion in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Cardiology*, v. 67, n. 4, p. 378–383, 2016.

DEVARAJ, S.; TOBIAS, P.; JIALAL, I. Knockout of toll-like receptor-4 attenuates the pro-inflammatory state of diabetes. *Cytokine*, v. 55, n. 3, p. 441–445, 2011.

DOU, Y.; ARLOCK, P.; ARNER, A. Blebbistatin specifically inhibits actin-myosin interaction in mouse cardiac muscle. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, v. 293, n. 3, p. C1148–1153, 2007.

EIGENTLER, A.; DRAXL, A.; WIETHÜCHTER, A.; KUZNETSOV, A. V.; LASSING, B.; GNAIGER, E. Laboratory protocol: Citrate synthase. A mitochondrial marker enzyme. *Mitochondrial Physiology Network*, v. 1704, p. 1–11, 2012.

EMORI, T.; ANTZELEVITCH, C. Cellular Basis for Complex T Waves and Arrhythmic Activity Following Combined IKr and IKs Block. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, v. 12, n. 12, p. 1369–1378, 2001.

ERICKSON, J. R.; PEREIRA, L.; WANG, L.; HAN, G.; FERGUSON, A.; DAO, K.; et al. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*, v. 502, n. 7471, p. 372–376, 2013.

ERNANDE, L.; BERGEROT, C.; RIETZSCHEL, E.R.; DE BUYZERE, M. L.; THIBAUT, H.; PIGNONBLANC, P.G. et al. Diastolic dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus: is it really the first marker of diabetic cardiomyopathy? *Journal of the American Society of Echocardiography*, v. 24, n. 11, p. 1268–1275, 2011.

FENG, W.; LEI, T.; WANG, Y.; FENG, R.; YUAN, J.; SHEN, X.; et al. GCN2 deficiency ameliorates cardiac dysfunction in diabetic mice by reducing lipotoxicity and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 130, p. 128–139, 2018.

FERREIRO, M.; PETROSKY, A. D.; ESCOBAR, A. L. Intracellular Ca²⁺ release underlies the development of phase 2 in mouse ventricular action potentials. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 302, n. 5, p. H1160–H1172, 2012.

FEUERER, M.; HERRERO, L.; CIPOLLETTA, D.; NAAZ, A.; WONG, J.; NAYER, A. et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature Medicine*, v. 15, n. 8, p. 930–939, 2009.

GALLEGO, M.; FERNÁNDEZ, D.; AHYAYAUCH, H.; CASIS, E.; CASIS, O. Reduced calmodulin expression accelerates transient outward potassium current inactivation in diabetic rat heart. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 22, n. 5–6, p. 625–634, 2008.

GALLEGO M. & CASIS O. *Diabetic Cardiomyopathy*. Springer Berlag, v. 9, p. 189–199, 2014.

GILBERT, E. R.; FU, Z.; LIU, D. Development of a Nongenetic Mouse Model of Type 2 Diabetes. *Experimental Diabetes Research*, v. 2011, p. 1–12, 2011.

GOLBIDI, S.; ALIREZA EBADI, S.; LAHER, I. Antioxidants in the Treatment of Diabetes. *Current Diabetes Reviews*, v. 7, n. 2, p. 106–125, 2011.

GOLDSMITH, S. J. Rosalyn S. Yalow: a personal and scientific memoir. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 53, n. 6, p. 21N, 2012.

GRUNDY, S. M.; BENJAMIN, I. J.; BURKE, G. L.; CHAIT, A.; ECKEL, R. H.; HOWARD, B. V. et al. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*, v. 100, n. 10, p. 1134–1146, 1999.

HEERINGA, J.; VAN DER KUIP, D. A.; HOFMAN, A.; KORS, J. A.; VAN HERPEN, G.; STRICKER, B. H.; et al. Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. *European Heart Journal*, v. 27, n. 8, p. 949–953, 2006.

HERDER, C.; DALMAS, E.; BÖNI-SCHNETZLER, M.; DONATH, M. Y. The IL-1 Pathway in Type 2 Diabetes and Cardiovascular Complications. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 26, n. 10, p. 551–563, 2015.

HERST, P. M.; ROWE, M. R.; CARSON, G. M.; BERRIDGE, M. V. Functional Mitochondria in Health and Disease. *Frontiers in Endocrinology*, v. 8, p. 296, 2017.

HEYMANS, S.; HIRSCH, E.; ANKER, S. D.; AUKRUST, P.; BALLIGAND, J. L.; COHEN-TERVAERT, J. W.; et al. Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *European Journal of Heart Failure*, v. 11, n. 2, p. 119–129, 2009.

HUXLEY, R. R.; FILION, K. B.; KONETY, S.; ALONSO, A. Meta-Analysis of Cohort and Case–Control Studies of Type 2 Diabetes Mellitus and Risk of Atrial Fibrillation. *The American Journal of Cardiology*, v. 108, n. 1, p. 56–62, 2011.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, *IDF Diabetes Atlas 8th edition*, 2017.

JENSEN, M. B.; JASPER, H. Mitochondrial proteostasis in the control of aging and longevity. *Cell Metabolism*, v. 20, n. 2, p. 214–225, 2014.

JØRGENSEN, P. G.; JENSEN, M. T.; MOGELVANG, R.; VON SCHOLTEN, B. J.; BECH, J.; FRITZ-HANSEN, J.; et al. Abnormal echocardiography in patients with type 2 diabetes

and relation to symptoms and clinical characteristics. *Diabetes & Vascular Disease Research*, v. 13, n. 5, p. 321–330, 2016.

JOSELYN ROJAS. Diabetes mellitus tipo 2, historia natural de la enfermedad, y la experiencia en el Centro de Investigaciones Endocrino Metabólicas “Dr. Félix Gómez”. v. V, n. 1, 2013.

JUNTILA, M. J.; TIKKANEN, J. T.; KENTTÄ, T.; ANTONEN, O.; ARO, A. L.; PORTHAN, K.; et al. Early repolarization as a predictor of arrhythmic and nonarrhythmic cardiac events in middle-aged subjects. *Heart Rhythm*, v. 11, n. 10, p. 1701–1706, 2014.

KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 106, n. 4, p. 473–481, 2000.

KANETO, H.; KATAKAMI, N.; MATSUHISA, M.; MATSUOKA, T. A. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, v. 2010, p. 453892, 2010.

KARAM, B. S.; CHAVEZ-MORENO, A.; KOH, W.; AKAR, J. G.; AKAR, F. G. Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes. *Cardiovascular Diabetology*, v. 16, n. 1, p. 120, 2017.

KARAMANOOU, M. Milestones in the history of diabetes mellitus: The main contributors. *World Journal of Diabetes*, v. 7, n. 1, p. 1, 2016.

KING, A. J. The use of animal models in diabetes research: Animal models of diabetes. *British Journal of Pharmacology*, v. 166, n. 3, p. 877–894, 2012.

KING, K. M.; RUBIN, G. A history of diabetes: from antiquity to discovering insulin. *British Journal of Nursing*, v. 12, n. 18, p. 1091–1095, 2003.

KOHLGRUBER, A.; LYNCH, L. Adipose Tissue Inflammation in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Current Diabetes Reports*, v. 15, n. 11, p. 92, 2015.

KORNYEYEV, D.; PETROSKY, A. D.; ZEPEDA, B.; FERREIRO, M.; KNOLLMANN, B.; ESCOBAR, A. L. Calsequestrin 2 deletion shortens the refractoriness of Ca²⁺ release and reduces rate-dependent Ca²⁺-alternans in intact mouse hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 52, n. 1, p. 21–31, 2012.

KOVACIC, J. C.; CASTELLANO, J. M.; FARKOUH, M. E.; FUSTER, V. The Relationships Between Cardiovascular Disease and Diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, v. 43, n. 1, p. 41–57, 2014.

LAGATHU, C.; YVAN-CHARVET, L.; BASTARD, J.P.; MAACHI, M.; QUINGARD-BOULANGÉ, A.; CAPEAU, J.; CARON, M. Long-term treatment with interleukin-1 β induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia*, v. 49, n. 9, p. 2162–2173, 2006.

LAKHTAKIA, R. The history of diabetes mellitus. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, v. 13, n. 3, p. 368–370, 2013.

LARSEN, S.; NIELSEN, J.; HANSEN, C. N.; NIELSEN, L. B.; WIBRAND, F.; STRIDE, N.; et al. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *The Journal of Physiology*, v. 590, n. 14, p. 3349–3360, 2012.

LEBOVITZ, H. E. Etiology and Pathogenesis of Diabetes Mellitus. *Pediatric Clinics of North America*, v. 31, n. 3, p. 521–530, 1984.

LEE, H.-M.; KIM, J. J.; KIM, H. J.; SHONG, M.; KU, B. J.; JO, E. K. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, v. 62, n. 1, p. 194–204, 2013.

LENGYEL, C.; VIRÁG, L.; BÍRÓ, T.; JOST, N.; MAGYAR, J.; BILICZKI, P.; et al. Diabetes mellitus attenuates the repolarization reserve in mammalian heart. *Cardiovascular Research*, v. 73, n. 3, p. 512–520, 2007.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUO, J.; QUAN, J.; TSAI, J.; HOBENSACK, C. K.; SULLIVAN, C.; HECTOR, R.; REAVEN, G. M. Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 47, n. 6, p. 663–668, 1998.

MA, L.; WANG, J.; LI, Y. Insulin resistance and cognitive dysfunction. *Clinica Chimica Acta*, v. 444, p. 18–23, 2015.

MACDONALD, M. R.; PETRIE, M. C.; HAWKINS, N. M.; PETRIE, J. R.; FISHER, M.; MCKELVIE, R. Diabetes, left ventricular systolic dysfunction, and chronic heart failure. *European Heart Journal*, v. 29, n. 10, p. 1224–1240, 2008.

MANDÒ, C.; ANELLI, G. M.; NOVIELLI, C.; PANINA-BORDIGNON, P.; MASSARI, M.; MAZZOCCO, M. I.; CETIN, I. Impact of Obesity and Hyperglycemia on Placental Mitochondria. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2018, p. 2378189, 2018.

MANGAN, M. S. J.; OLHAVA, E. J.; ROUSH, W. R.; SEIDEL, H. M.; GLICK, G. D.; LATZ, E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 17, n. 8, p. 588–606, 2018.

MARTINEZ, R.; KAPRAVELOU, G.; LÓPEZ-CHAVES, C.; CÁCERES, E.; COLL-RISCO, I.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, C.; et al. Aerobic interval exercise improves renal functionality and affects mineral metabolism in obese Zucker rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2018.

MEJÍA-ALVAREZ, R.; MANNO, C.; VILLALBA-GALEA, C. A.; DEL VALLE FERNÁNDEZ, L.; COSTA, R. R.; FILL, M.; et al. Pulsed local-field fluorescence microscopy: a new approach

for measuring cellular signals in the beating heart. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, v. 445, n. 6, p. 747–758, 2003.

MONNERAT, G.; ALARCÓN, M. L.; VASCONCELLOS, L. R.; HOCHMAN-MENDEZ, C.; BRASIL, G.; BASSANI, R. A.; et al. Macrophage-dependent IL-1 β production induces cardiac arrhythmias in diabetic mice. *Nature Communications*, v. 7, p. 13344, 2016.

MOSS, A. J.; SCHWARTZ, P. J.; CRAMPTON, R. S.; TZIVONI, D.; LOCATI, E. H.; MACCLUER, J. et al. The long QT syndrome. Prospective longitudinal study of 328 families. *Circulation*, v. 84, n. 3, p. 1136–1144, 1991.

NATTEL, S.; HARADA, M. Atrial Remodeling and Atrial Fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 63, n. 22, p. 2335–2345, 2014.

NERBONNE, J. M.; KASS, R. S. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological Reviews*, v. 85, n. 4, p. 1205–1253, 2005.

NICOL, D. S. H. W.; SMITH, L. F. Amino-Acid Sequence of Human Insulin. *Nature*, v. 187, n. 4736, p. 483–485, 1960.

O'BRIEN, R. M.; GRANNER, D. K. Regulation of gene expression by insulin. *Physiological Reviews*, v. 76, n. 4, p. 1109–1161, 1996.

OE, H.; NAKAMURA, K.; KIHARA, H.; SHIMADA, K.; FUKUDA, S.; TAKAGI, T.; et al. Comparison of effects of sitagliptin and voglibose on left ventricular diastolic dysfunction in patients with type 2 diabetes: results of the 3D trial. *Cardiovascular Diabetology*, v. 14, n. 1, p. 83-96, 2015.

OKOSHI K., G. J. F.; DI MUZIO B.P., F. A. A.; OKOSHI M.P. Miocardiopatía diabética. v. 51, n. 2, p. 160–167, 2007.

OLOKOBA, A. B.; OBATERU, O. A.; OLOKOBA, L. B. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Medical Journal*, v. 27, n. 4, p. 269–273, 2012.

OTERA, H.; MIHARA, K. Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *Journal of Biochemistry*, v. 149, n. 3, p. 241–251, 2011.

PÁLSSON, R.; PATEL, U. D. Cardiovascular Complications of Diabetic Kidney Disease. *Advances in Chronic Kidney Disease*, v. 21, n. 3, p. 273–280, 2014.

PARK, Y. J.; WARNOCK, G. L.; AO, Z.; SAFIKHAN, N.; MELOCHE, M.; ASADI, A.; et al. Dual role of interleukin-1 β in islet amyloid formation and its β -cell toxicity: Implications for type 2 diabetes and islet transplantation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 19, n. 5, p. 682–694, 2017.

PATEL, R.; DWIVEDI, M.; MANSURI, M. S.; ANSARULLAH; LADDHA, N. C.; THAKKER, A.; et al. Association of Neuropeptide-Y (NPY) and Interleukin-1beta (IL1B), Genotype-

Phenotype Correlation and Plasma Lipids with Type-II Diabetes. *PloS One*, v. 11, n. 10, p. e0164437, 2016.

PECOITS-FILHO, R.; ABENSUR, H.; BETÓNICO, C. C.; MACHADO, A. D.; PARENTE, E. B.; QUEIROZ, M.; et al. Interactions between kidney disease and diabetes: dangerous liaisons. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, v. 8, n. 1, p. 50-71, 2016.

PERNAS, L.; SCORRANO, L. Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annual Review of Physiology*, v. 78, p. 505–531, 2016.

RANIERI, M.; BRAJKOVIC, S.; RIBOLDI, G.; RONCHI, D.; RIZZO, F.; BRESOLIN, N.; et al. Mitochondrial fusion proteins and human diseases. *Neurology Research International*, v. 2013, p. 293893, 2013.

REED, M. J.; MESZAROS, K.; ENTES, L. J.; CLAYPOOL, M. D.; PINKETT, J. G.; GADBOIS, T. M.; REAVEN, G. M. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism*, v. 49, n. 11, p. 1390–1394, 2000.

REES, D. A.; ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, v. 22, n. 4, p. 359–370, 2005.

RINGER, S. A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *The Journal of Physiology*, v. 4, n. 1, p. 29–42, 1883.

ROBILLON, J. F.; SADOUL, J. L.; BENMERABET, S.; JOLY-LEMOINE, L.; FREIDENRICH, A.; CANIVET, B. Assessment of cardiac arrhythmic risk in diabetic patients using QT dispersion abnormalities. *Diabetes & Metabolism*, v. 25, n. 5, p. 419–423, 1999.

SADEGHI, A.; BEIGY, M.; ALIZADEH, S.; MAZLOOM, H.; VAKILI, S.; AHMADI, S.; MESHKANI, R. Synergistic Effects of Ad-Libitum Low-Dose Fructose Drinking and Low-Dose Streptozotocin Treatment in Wistar Rats: A Mild Model of Type 2 Diabetes. *Acta Medica Iranica*, v. 55, n. 5, p. 304–310, 2017.

SAKAMOTO, M.; MATSUTANI, D.; KAYAMA, Y. Possibility of a New Therapeutic Strategy for Left Ventricular Dysfunction in Type 2 Diabetes. *Journal of Clinical Medicine Research*, v. 10, n. 11, p. 799–805, 2018.

SAUKKONEN, T.; MUTT, S. J.; JOKELAINEN, J.; SAUKKONEN, A. M.; RAZA, G. M.; KARHU, T.; et al. Adipokines and inflammatory markers in elderly subjects with high risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 12816-12824, 2018.

SCHADEWALDT, H. The History of Diabetes mellitus. In: VON ENGELHARDT, D. (Ed.). *Diabetes Its Medical and Cultural History*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 43–100, 1989.

SCHAIBLE, T. F.; SCHEUER, J. Effects of physical training by running or swimming on ventricular performance of rat hearts. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology*, v. 46, n. 4, p. 854–860, 1979.

SENSI, F. D.; CONSTANTINO, C.; LIMBRUNO, U.; PANENI, F. Atrial fibrillation in the cardiometabolic patient. *Minerva Medica*, 2018.

SPRANGER, J.; KROKE, A.; MÖHLIG, M.; HOFFMANN, K.; BERGMANN, M. M.; RISTOW, M.; et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*, v. 52, n. 3, p. 812–817, 2003.

SRINIVASAN, K.; VISWANAD, B.; ASRAT, L.; KAUL, C. L.; ROMARAO, P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological Research*, v. 52, n. 4, p. 313–320, 2005.

SZUSZKIEWICZ-GARCIA, M. M.; DAVIDSON, J. A. Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, v. 43, n. 1, p. 25–40, 2014.

TADIC, M.; CUSPIDI, C. Type 2 diabetes mellitus and atrial fibrillation: From mechanisms to clinical practice. *Archives of Cardiovascular Diseases*, v. 108, n. 4, p. 269–276, 2015.

TI, Y.; XIE, G. L.; WANG, Z. H.; BI, X. L.; DING, W. Y.; WANG, J.; et al. TRB3 gene silencing alleviates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetic rat model. *Diabetes*, v. 60, n. 11, p. 2963–2974, 2011.

TIEH, P.; DREIMANE, D. Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *Indian Journal of Pediatrics*, v. 81, n. 2, p. 165–169, 2014.

TORRES-JACOME, J.; GALLEGO, M.; RODRÍGUEZ-ROBLEDO, J. M.; SANCHEZ-CHAPULA, J. A.; CASIS, O. Improvement of the metabolic status recovers cardiac potassium channel synthesis in experimental diabetes. *Acta Physiologica*, v. 207, n. 3, p. 447–459, 2013.

VALLEJO, J. G. Role of Toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Clinical Science*, v. 121, n. 1, p. 1–10, 2011.

VALVERDE, C. A.; KORNYEYEV, D.; FERREIRO, M.; PETROSKY, A. D.; MATTIAZZI, A.; ESCOBAR, A. L. Transient Ca²⁺ depletion of the sarcoplasmic reticulum at the onset of reperfusion. *Cardiovascular Research*, v. 85, n. 4, p. 671–680, 2010.

VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. *Physiological Reviews*, v. 91, n. 1, p. 79–118, 2011.

VAN DIJK, T. H.; LASKEWITZ, A. J.; GREFFHORST, A.; BOER, T. S.; BLOKS, V. W.; KUIPERS, F.; et al. A novel approach to monitor glucose metabolism using stable isotopically labelled glucose in longitudinal studies in mice. *Laboratory Animals*, v. 47, n. 2, p. 79–88, 2013.

VAN GAAL, L. F.; MERTENS, I. L.; DE BLOCK, C. E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, v. 444, n. 7121, p. 875–880, 2006.

VATTAM, K.; RAGHAVENDRAN, H.; MURALI, M. R.; SAVATEY, H.; KAMARUL, T. Coadministration of alloxan and nicotinamide in rats produces biochemical changes in blood and pathological alterations comparable to the changes in type II diabetes mellitus. *Human & Experimental Toxicology*, v. 35, n. 8, p. 893–901, 2016.

VEGLIO, M.; BRUNO, G.; BORRA, M.; MACCHIA G.; BARGER, G.; D'ERRICO, N; et al. Prevalence of increased QT interval duration and dispersion in type 2 diabetic patients and its relationship with coronary heart disease: a population-based cohort. *Journal of Internal Medicine*, v. 251, n. 4, p. 317–324, 2002.

WARD, M.-L.; CROSSMAN, D. J. Mechanisms underlying the impaired contractility of diabetic cardiomyopathy. *World Journal of Cardiology*, v. 6, n. 7, p. 577–584, 2014.

WESTMAN, E. C.; TONDT, J.; MAGUIRE, E.; YANCY, W. S. Jr. Implementing a low-carbohydrate, ketogenic diet to manage type 2 diabetes mellitus. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, v. 13, n. 5, p. 263–272, 2018.

WHITE, M. F. Insulin signaling in health and disease. *Science*, v. 302, n. 5651, p. 1710–1711, 2003.

WIEDEMANN, N.; PFANNER, N. Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annual Review of Biochemistry*, v. 86, p. 685–714, 2017.

WU, J.; ZHANG, R.; TORREGGIANI, M.; TING, A.; XIONG, H.; STRIKER, G. E.; et al. Induction of Diabetes in Aged C57B6 Mice Results in Severe Nephropathy. *The American Journal of Pathology*, v. 176, n. 5, p. 2163–2176, 2010.

XU, Z.; PATEL, K. P.; LOU, M. F.; ROZANSKI, G. J. Up-regulation of K(+) channels in diabetic rat ventricular myocytes by insulin and glutathione. *Cardiovascular Research*, v. 53, n. 1, p. 80–88, 2002.

YAN, G. X.; ANTZELEVITCH, C. Cellular basis for the electrocardiographic J wave. *Circulation*, v. 93, n. 2, p. 372–379, 1996.

YAO, C.; VELEVA, T.; SCOTT, L. Jr.; CAO, S.; CHEN, G.; JEYBAL, P.; et al. Enhanced Cardiomyocyte NLRP3 Inflammasome Signaling Promotes Atrial Fibrillation. *Circulation*, v. 138, n. 20, p. 2227–2242, 2018.

YIN, F. C.; SPURGEON, H. A.; RAKUSAN, K.; WEISFELDT, M. L.; LAKATTA, E. G. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *The American Journal of Physiology*, v. 243, n. 6, p. H941–947, 1982.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, v. 414, n. 6865, p. 782–787, 2001.

ZOPPINI, G.; BERGAMINI, C.; BONAPACE, S.; ROSSI, A.; TROMBETTA, M.; MANTOVANI, A.; et al. Association between subclinical left ventricular systolic dysfunction and glycemic control in asymptomatic type 2 diabetic patients with preserved left ventricular function. *Journal of Diabetes and its Complications*, v. 31, n. 6, p. 1035–1040, 2017.

ZOPPINI, G.; BERGAMINI, C.; BONAPACE, S.; TROMBETTA, M.; MANTOVANI, A.; TOFFALINI, A.; et al. Left ventricular chamber dilation and filling pressure may help to categorise patients with type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, v. 6, n. 1, p. e000529, 2018.