



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - FACULDADE DE MEDICIA
INSTITUTO DO CORAÇÃO EDSON SAAD
LABORATÓRIO DE CARDIOIMUNOLOGIA



YGOR SCHLEIER FRANCISCO DAS CHAGAS

**ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE INATA NAS ALTERAÇÕES
ELÉTRICARDIOGRÁFICAS NO MODELO DE DIABETES DO TIPO I: PAPEL
DO TLR4**

Rio de Janeiro

Julho, 2019

Ygor Schleier Francisco das Chagas

ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE INATA NAS ALTERAÇÕES
ELÉTRICARDIOGRÁFICAS NO MODELO DE DIABETES DO TIPO I: PAPEL
DO TLR4

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de PósGraduação 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

Rio de Janeiro

Julho de 2019

“Se nada mudar, invente, e quando mudar, entenda. Se ficar difícil, enfrente, e quando ficar fácil, agradeça. Se a tristeza rondar, alegre-se, e quando ficar alegre, contagie. E quando recomeçar, acredite, você pode tudo.”

Autor desconhecido

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus e aos Orixás por me darem o dom da vida e por me permitirem chegar até onde cheguei.

Aos meus pais, Carla Schleier e Demá Chagas e ao meu irmão Yan Schleier por sempre me apoiarem e me incentivarem nos momentos mais difíceis. Essa vitória também é de vocês!

A toda família Schleier e Chagas, por sempre levantarem minha auto-estima... Vocês me fornecem todo combustível necessário para seguir adiante superando qualquer desafio.

Aos meus grandes amigos Robson e Kayky, agradeço por todos esses anos de amizade. Vocês são imprescindíveis na minha vida. À vocês todo o meu afeto e gratidão.

A minha amiga Ainá por toda a sua dedicação e empenho. Sempre disposta a me ajudar e me aconselhar nos momentos mais difíceis. Você é um ser humano sensacional!

A todos os meus amigos que de forma direta ou indireta fizeram parte dessa conquista.

Ao meu orientar Emiliano Medei, muito obrigado! Foi incrível poder compartilhar juntamente ao seu lado essa paixão pela pesquisa. Agradeço imensamente por mesmo nos momentos mais difíceis acreditar no meu potencial e no meu trabalho. Você é um exemplo de pesquisador!

A minha “mãe científica” Micaela Alarcón por toda sua dedicação e empenho. Vivemos momentos intensos, porém uma experiência que jamais irei esquecer. Aprendi muito trabalhando ao seu lado. Grande parte do que me tornei agradeço à você!

Aos grandes amigos do laboratório de cardioimunologia: Ainhoa, obrigado por ter me recebido com todo afeto e por estar sempre disponível para me ajudar. Você é um ser humano incrível! A Julieta, com quem passei pouco tempo, mas

aprendi bastante. Ao Bruno e a Thabata por toda a disponibilidade em sanar minhas dúvidas e me aconselharem durante essa minha pequena trajetória científica. Oscar, obrigado pelos debates e ensinamentos sobre arritmias, você é um excelente profissional. Aos ICs Julia e Guilherme, obrigado por toda ajuda, carinho e alegria. Desejo a vocês uma excelente trajetória profissional e muito sucesso. Todos vocês foram como uma família durante esses anos.

Agradeço a todos os membros do Laboratório de Eletrofisiologia Cardíaca, Emanuelle, Ana Paula, Mara, Natalia, Antônio, Henry, Thais Bazoti e Thais Barenco, Leonardo, Edila, Dahienne, Paulo César e Fernando. Sei que todos vocês torceram por mim!

Agradeço aos membros do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular. Em especial a Bruna Farjun, por toda paciência e doçura ao me ensinar a técnica de PCR, além de sempre ter uma palavra de conforto e ter me motivado quando eu mais precisei. Gratidão! Beatriz Toja pela amizade que construímos e por toda ajuda que me forneceu durante esses anos.

Agradeço ao Prof Dr Roberto Coury Pedrosa, por todos os ensinamentos e aprimoramentos nas análises de arritmias cardíacas. Você contribui muito para esse trabalho!

Agradeço a coordenadora Glaucia de Oliveira e ao programa de pós-graduação em Cardiologia da UFRJ pela oportunidade de realizar meu trabalho.

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

Resumo

DAS CHAGAS, Ygor Schleier Francisco. **Estudo da resposta imune inata nas alterações eletrocardiográficas no modelo de diabetes do tipo 1: Papel do tlr4**. Rio de Janeiro, julho, 2019. Dissertação de Mestrado, Medicina (Cardiologia), Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Introdução: O Diabetes *mellitus* do tipo I (DMI) é uma doença ocasionada pela destruição das células- β pancreáticas nas ilhotas de *Langherans*, que resulta em uma deficiência na produção de insulina, provocando altos níveis de glicemia e disfunção de diferentes órgãos, incluindo o coração. O remodelamento elétrico cardíaco é característico em pacientes diabéticos crônicos, os quais apresentam alterações na repolarização ventricular e arritmias cardíacas, importantes preditores de morte súbita. O DMI também é caracterizado por uma inflamação exacerbada, fazendo com que receptores do tipo toll 4 (TLR4) aumentem sua atividade e disparem cascatas de sinalização culminando em maior liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Objetivo: Estudar as alterações eletrocardiográficas desencadeadas pelo DMI, assim como avaliar o papel do TLR4 nesse remodelamento.

Métodos: Animais NOD fêmeas foram utilizados 4 semanas após a detecção de hiperglicemia e comparados com seu respectivo controle NOR. Também utilizamos camundongos C57BL/6 machos e fêmeas induzidos por STZ (50mg/kg) por 5 dias consecutivos, assim como animais TLR4^{-/-} de ambos os sexos após 8 semanas da indução. A atividade eletrocardiográfica foi estudada *in vivo* na derivação D1. 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).

Resultados: Após 4 semana de detecção de hiperglicemia os animais nod apresentaram alterações no Intervalo PR ($29,87 \pm 0,6$ vs $33,47 \pm 1,3$ ms), Onda P ($10,50 \pm 0,3$ vs $13,05 \pm 0,5$ ms) e Intervalo QJ ($21,59 \pm 0,4$ vs $27,83 \pm 1,2$ ms), quando comparados ao seu respectivo controle NOR. Na análise de arritmias cardíacas os animais NOD apresentaram uma dispersão nos resultados,

impossibilitando uma conclusão. No modelo de STZ, optamos por realizar um estudo dependente de gênero e nos machos encontramos os intervalo QJ aumentado ($20,98 \pm 0,3$ vs $26,45 \pm 0,3$ ms) refletindo em uma maior susceptibilidade de desenvolver arritmias. Ao analisarmos as fêmeas podemos observar um aumento do Intervalo PR ($33,39 \pm 0,5$ vs $37,13 \pm 0,3$ ms) assim como o QJ ($21,00 \pm 0,3$ vs $23,03 \pm 0,4$ ms) e maior pré-disposição a desenvolver arritmia. Ao utilizarmos animais TLR4^{-/-} de maneira sexo-específico para o estudo da modulação eletrocardiográfica, observamos que os machos apresentaram aumento do intervalo QJ ($21,01 \pm 0,3$ vs $26,16$ ms). Surpreendentemente as fêmeas TLR4^{-/-} conseguiram prevenir as alterações elétricas cardíacas. Tendo ambos os sexos prevenidos a ocorrência de arritmias cardíacas.

Conclusões: Ambos os modelos de DMI apresentaram alterações na repolarização inicial, caracterizada pelo intervalo QJ; Os animais WT STZ apresentaram maior vulnerabilidade a eventos arrítmicos; Fêmeas TLR4^{-/-} conseguiram prevenir as alterações elétricas cardíacas.

Palavras Chaves: Diabetes Mellitus, Cardiomiopatia Diabética, Sistema Imune Inato, TLR4, ECG, Arritmias cardíacas, Dimorfismo Sexual.

Abstract

DAS CHAGAS, Ygor Schleier Francisco. **Study of the response immune innate in electrocardiographic alteration in the type 1 diabetes model: Role of tlr4.** Rio de Janeiro, Julho, 2019. Masters dissertation, Medicine (Cardiology), Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Type 1 Diabetes *mellitus* (T1DM) is a disease caused by the destruction of pancreatic β -cells in the Langerhans islets, which results in a deficiency of insulin production, leading to high blood glucose levels and to multiple organs dysfunction, including the heart. Cardiac electrical remodeling is characteristic in chronic diabetic patients, who present alterations in ventricular repolarization and cardiac arrhythmias, important predictors of sudden death. DMI is also characterized by exacerbated inflammation, causing toll 4 (TLR4) receptors to increase their activity and trigger signaling cascades culminating in greater release of proinflammatory cytokines.

Objective: To study the electrocardiographic changes triggered by DMI, as well as to evaluate the role of TLR4 in this remodeling.

Methods: Female NOD animals were used 4 weeks after detection of hyperglycemia and compared to their respective control (NOR). We also used STZ - induced male and female C57BL / 6 mice (50mg / kg) for 5 consecutive days, as well as TLR4^{-/-} animals of both sexes after 8 weeks of induction. The electrocardiographic activity was studied *in vivo*, in D1 derivation. Vulnerability to developing cardiac arrhythmias was assessed by *in vivo* protocol that combines caffeine (120 mg / kg i.p) and dobutamine (50 μ g / kg i.v).

Results: After 4 weeks of detection of hyperglycaemia, the NOD animals presented changes in the PR interval (29.87 ± 0.6 vs 33.47 ± 1.3 ms), P wave (10.50 ± 0.3 vs 13.05 ± 0.5 ms) and Interval QJ (21.59 ± 0.4 vs 27.83 ± 1.2 ms), when compared to their respective NOR control. Analysis of cardiac arrhythmias NOD animals presented a dispersion the results, making a

conclusion impossible. STZ model, we chose to perform a gender-dependent study and in the males we found the QJ interval increased (20.98 ± 0.3 vs 26.45 ± 0.3 ms) reflecting a greater susceptibility to develop arrhythmias. When we analyzed the females we observed an increase the PR interval (33.39 ± 0.5 vs 37.13 ± 0.3 ms) as well as QJ (21.00 ± 0.3 vs 23.03 ± 0.4 ms) and a higher predisposition to develop arrhythmia. When using TLR4^{-/-} animals in a sex-specific manner for the study of electrocardiographic modulation, we observed that males showed an increase in QJ interval (21.01 ± 0.3 vs 26.16 ms). Surprisingly, TLR4^{-/-} females were able to prevent cardiac electrical changes. Having both sexes prevented the occurrence of cardiac arrhythmias.

Conclusions: Both DMI models presented alterations in initial repolarization, characterized by QJ interval; WT STZ animals presented greater vulnerability to arrhythmic events; TLR4^{-/-} females were able to prevent cardiac electrical changes.

Key Words: Diabetes Mellitus, Diabetic Cardiomyopathy, Innate Immune System, TLR4, ECG, Cardiac Arrhythmias, Sexual Dimorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativa mundial de novos casos de diabetes -	18
Figura 2 – Modelo de ativação do inflamossoma NLRP3 via TLR's e clivagem e liberação de IL-1 β	23
Figura 3 - Mecanismos propostos mediante a ativação dos receptores TLR4 .	24
Figura 4 - Traçado representativo do eletrocardiograma em camundongo	30
Figura 5 -Traçado representativo durante o protocolo de arritmia através da administração de cafeína e dobutamina. A linha vermelha demonstra uma taquicardia ventricular. Na figura ao lado observa-se um traçado controle. (adaptado de Monnerat. G et al, 2017)	31
Figura 6– Animais NOD apresentam aumento da concentração de glicose no sangue	36
Figura 7 – O modelo NOD gera um remodelamento elétrico cardíaco.....	37
Figura 8 – Animais NOD apresentam maior vulnerabilidade a arritmias	38
Figura 9 - O TLR4 não esta envolvido nas alterações biométricas e metabólicas em camundongos machos	46
Figura 11 – A falta de TLR4 em camundongos machos não preveniu o aumento do intervalo QJ.	50
Figura 12 - Fêmeas TLR4 ^{-/-} previnem o aumento do intervalo QJ no modelo de DMI.....	52
Figura 13 – A falta do receptor TLR4 preveniu a severidade de arritmias em ambos os gêneros.....	53
Figura 14 - Machos apresentam maior expressão de receptores TLR4 em comparação com fêmeas.	54
Figura 15 - Fêmeas TLR4 ^{-/-} apresentam uma redução da expressão dos receptores de estrogênio em corações.	55
Figura 16 - Parâmetros biométricos e metabólicos em animais ovariectomizados	56
Figura 17 - Parâmetros elétricos dos camundongos ovariectomizados	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs: Produtos finais da glicação avançada, do Inglês *Advanced glycation end products*

AHA: Associação Americana do Coração, do Inglês *American Heart Association*

APA: Amplitude do potencial de ação ASC: Proteína associada a apoptose, do Inglês Apoptosis-associated speck-like protein

ATP: Adenosina trifosfato

CaMKII: Calmodulina dependente de quinase II

CASP1: Caspase-1 do Inglês Caspase activation and recruitment domains 1

DC: Doenças cardiovasculares

DM: Diabetes Mellitus

DAMP's: Padrões Moleculares Associados a Danos, do Inglês Damage-Associated Molecular Patterns

DMI: Diabetes Mellitus tipo I

DMII: Diabetes Mellitus tipo II

E: Estrógeno

ER: Receptores de estrogênio

FFAs: Ácidos graxos livres, do Inglês Free fatty acids

HLA: Antígeno leucocitário humano, do Inglês Human leukocyte antigen

IAA: Autoanticorpo contra insulina, do Inglês Insulin autoantibodies

IC: Insuficiência Cardíaca

IDF: Federação Internacional do Diabetes, do Inglês International Diabetes Federation

IL: Interleucina

IL-1 β : Interleucina-1 β

IL-6 – Interleucina-6

IM – Infarto do Miocárdio

IRF3: Fator de transcrição regulatório de interferon 3

LPS: Lipopolisacarídeo

Ito: Corrente de repolarizante de saída de potássio, do Inglês Transient Outward Potassium Current

KCHIP2: Proteína de interação com o canal Kv, do Inglês Kv channel-interacting protein 2 Kv:

MCD: Miocardiopatia diabética

MyD88: Proteína de diferenciação mielóide 88

NAD: Neuropatia Autonômica Diabética

NCX: Trocador sódio-cálcio

NF-kB: Fator de transcrição nuclear kappa B, do Inglês, nuclear transcription factor kappa B

NOD: Diabetes Não Obeso, do inglês *Non-obese diabetic*

NOR: Não Obeso Diabetes Resistente, do inglês: *Non-Obese Diabetes Resistant*

PA: Potencial de ação

PAMP's: Padrões Moleculares Associados a Patógenos, do Inglês Pathogen-Associated Molecular Patterns

PBS: Tampão de fosfato, do Inglês Phosphate-buffered saline

PKC: Proteína kinase C

ROS: Espécies reativas do oxigênio, do Inglês Reactive oxygen species

RyR2: Receptor de rianodina subtipo 2

SERCA: Proteína Ca²⁺ ATPase sarcoplasmática

STZ: Estreptozotocina

TGF- β : Fator de transformação de crescimento beta Th1: Resposta celular de tipo T helper 1, do Inglês T helper cells response

TLR: Receptores de tipo toll

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TRIF: Dominio adaptador TIR de indução ao interferão β do Inglês TIR-domaincontaining adapter-inducing interferon- β

VT: Taquicardia ventricular; do Inglês Ventricular tachycardia

WHO: Organização Mundial da Saúde, do Inglês World Health Organisation

Sumário

INTRODUÇÃO	15
1.2 DIABETES MELLITUS	17
1.3 DIABETES <i>MELLITUS</i> DO TIPO I	18
1.4 DIABETES <i>MELLITUS</i> DO TIPO II	19
1.5 CARDIOMIOPATIA DIABÉTICA	20
Diabetes Mellitus e o sistema imune inato	21
1.6 HIPERGLICEMIA E SISTEMA IMUNE INATO	21
1.8 PAPEL DO SISTEMA IMUNE INATO NAS ALTERAÇÕES ELÉTRICAS CARDIACAS	23
1.9 RESPOSTA SEXO ESPECIFICA NA IMUNIDADE INATA	25
1.10 DIMORFISMO SEXUAL E DIABETES	26
2. MATERIAS E MÉTODOS	28
2.1 ANIMAIS	28
2.2 MODELO EXPERIMENTAL (Diabetes <i>Mellitus</i> do Tipo I)	28
2.3 MEDIDAS DE HIPERTROFIA CARDÍACA E UTERINA	29
2.4 CIRURGIA DE OVARIECTOMIA (OVX)	29
2.6 ANÁLISES MOLECULARES	31
2.7 Análise Estatística	32
Capitulo I	33
3. HIPOTESE DO TRABALHO I	34
4. OBJETIVO GERAL DO TRABALHO I	34
4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	34
5. RESULTADOS	35
6. Discussão I	40
7. CONCLUSÕES I	43
Capitulo II	44
8. Hipótese de trabalho II	45
9. Objetivo geral da proposta II	45
9.1 Objetivos específicos	45
13. Referências Bibliográficas	63

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte em todo mundo. Estima-se que em 2030, aproximadamente 23 milhões de pessoas venham a óbito por esta causa, totalizando 31% de todas as mortes no mundo (WHO, 2014). No Brasil, dados do Ministério da Saúde indicam que 30% do total de mortes ocorrem devido a doenças cardiovasculares, fazendo com que esta lidere o ranking de mortes em todo o país (Malta *et al.*, 2014).

Fatores comportamentais, metabólicos, socioeconômicos e genéticos contribuem para o desenvolvimento de disfunções cardíacas (WHO, 2011). Nesse sentido, foi estabelecido um link entre o Diabetes *Mellitus* (DM) e as DCV. Essa relação é devida as DCV serem uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com DM (Leon, 2015).

O DM é uma síndrome metabólica caracterizada por um aumento dos níveis de glicose no sangue (Israili, 2011). Dentre os tipos principais de diabetes podemos destacar a diabetes *mellitus* do tipo I (DMI) e diabetes *mellitus* do tipo II (DMII).

O DMI, também conhecido como insulino dependente é ocasionado pela destruição das células beta pancreáticas nas ilhotas de *Langherans*, resultando na insuficiência da produção de insulina, acometendo principalmente crianças e adolescentes (Katsarou *et al.*, 2017)(Bluestone *et al.*, 2016)(Schmidt, Valeri e Leslie, 2005).

Já o DMII, representa aproximadamente 90% de todos os pacientes diagnosticados com diabetes no mundo, estando intimamente relacionado aos hábitos de vida (Leon, 2015). Comumente apresenta-se em idades tardias e é caracterizado através da resistência a insulina (Israili, 2011).

Pacientes crônicos com DM apresentam disfunções em diversos órgãos e sistemas. Dentre esses distúrbios associados à hiperglicemia destacam-se as doenças isquêmicas, remodelamentos mecânicos e elétricos do coração, além da exacerbação da resposta inflamatória local e sistêmica

(Katsarou *et al.*, 2017)(Suys *et al.*, 2006) (Gupta *et al.*, 2017)(Dogan *et al.*, 2006).

Um dos principais moduladores da resposta inflamatória são os hormônios sexuais (Vitale, *et al.*, 2009). Atualmente muito se tem discutido sobre a influência do gênero na regulação do sistema imunológico. Nesse contexto, as mulheres apresentam uma resposta imunológica mais adaptada em relação aos homens (Dow *et al.*, 2015)(Klein e Flanagan, 2016). Em parte pode-se atribuir essa melhor adaptação ao estrogênio, um importante hormônio feminino que possui efeitos cardioprotetores e imunomoduladores (Chuang *et al.*, 2013)(Odening *et al.*, 2012)(Jin *et al.*, 2006). Tendo esse presente trabalho a proposta de estudar como o sistema imune através da ativação de um dos seus principais receptores, o receptor do tipo *toll 4* (TLR4), pode atuar nas alterações cardíacas induzidas no modelo Murilo de DMI de maneira sexo-específico.

Nas últimas décadas o número de novos casos de DM cresceu exponencialmente, fazendo com que essa enfermidade se tornasse um dos principais problemas relacionados à saúde pública. Nesse cenário, diversos grupos de pesquisa vêm se propondo a realizar estudos que visam ajudar a compreender melhor a fisiopatologia do DM. Para a realização desses estudos na área básica são utilizados alguns modelos: O modelo de STZ, que já é vastamente utilizado em inúmeros trabalhos e o modelo NOD, que são animais transgênicos que desenvolvem DMI de maneira espontânea. Através dessas ferramentas buscamos realizar uma caracterização e comparação entre esses dois modelos estabelecidos para o estudo de DMI.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2 DIABETES MELLITUS

Atualmente, 422 milhões de adultos possuem diabetes no mundo. Um estudo realizado em 2012 pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2016) demonstrou que 1,5 milhões de mortes foram ocasionadas pelo *Diabetes Mellitus* (DM). Estima-se que em 2040, mais de 642 milhões de pessoas viverão com diabetes, dos quais 193 milhões permanecerão sem um diagnóstico clínico (Figura). Esse alto número de pessoas não diagnosticadas atribui-se ao fato do DM ser uma doença silenciosa e a precariedade ao acesso rápido ao Sistema Único de Saúde (SUS). Tornando essa síndrome uma das maiores preocupações no mundo, devido a sua grande taxa de morbidade e mortalidade (IDF Diabetes Atlas 2015) (Figura 1).

Anualmente são gastos aproximadamente 650 bilhões de dólares com o DM e estimativas indicam um aumento em 19% para o ano de 2040. Esses dados representam um impacto significativo na economia mundial (IDF Diabetes Atlas 2015).

O DM é uma síndrome metabólica caracterizada por um aumento dos níveis de glicose no sangue (Diabetes Care, 2004). Dentre os tipos principais de diabetes podemos destacar a diabetes *mellitus* do tipo I (DMI) e diabetes *mellitus* do tipo II (DMII).

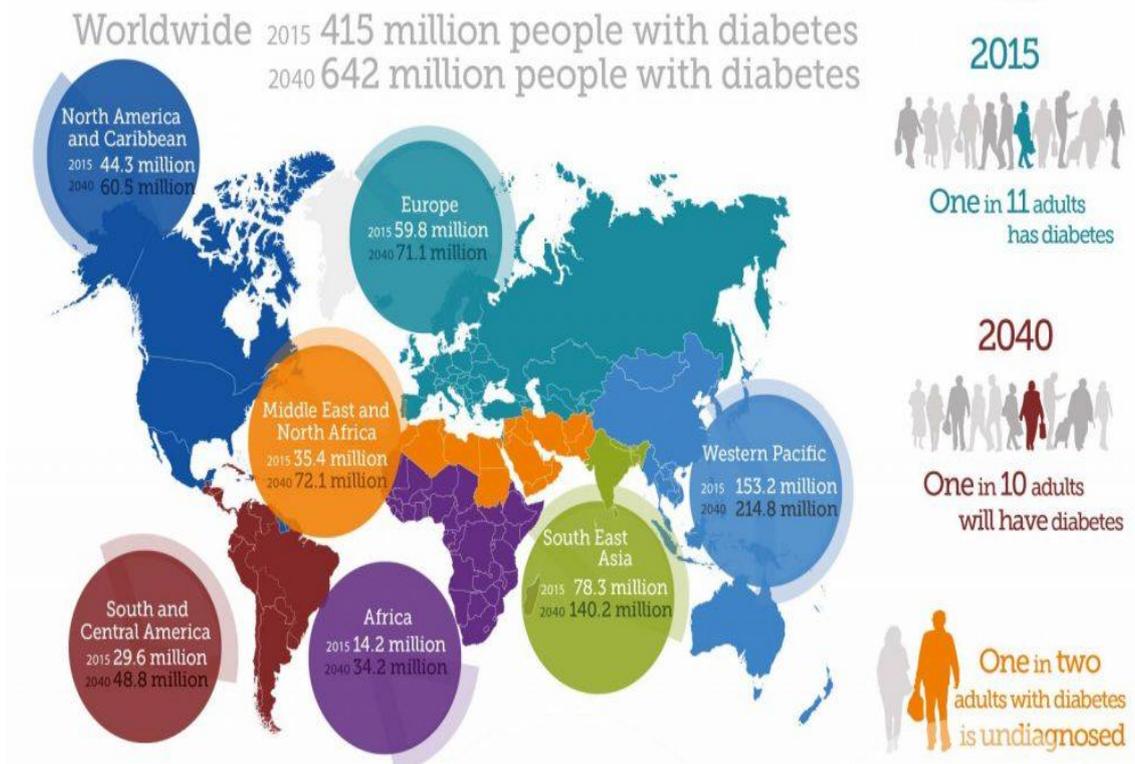


Figura 1 - Estimativa mundial de novos casos de diabetes - De acordo com o mapa podemos observar a distribuição de casos diagnosticados de diabetes em cada continente. São estimados que 1 adulto entre 10 possua diabetes onde 1 adulto entre 2 não possua diagnóstico. Fonte: IDF ATLAS (2016)

1.3 DIABETES MELLITUS DO TIPO I

O DMI, também conhecido como insulino-dependente ainda não se sabe qual a fisiopatologia da mesma, entretanto, existe uma produção de auto-anticorpos que levam a destruição das células beta pancreáticas nas ilhotas de *Langherans*, resultando na insuficiência da produção de insulina. Esta doença de etiologia ainda debatida, entretanto de predominância auto-imune tende acometer principalmente crianças e adolescentes. Totalizam aproximadamente 10% dos casos de DM e acomete 1.4 milhões de pessoas nos EUA tendo um aumento da sua incidência em todo o mundo (Schmidt, Valeri e Leslie, 2005).

As doenças autoimunes como o DMI afetam 20% da população mundial. As principais causas envolvidas nessas patologias são as intensificações das respostas do sistema imune tanto inato como adaptativo,

aos quais levam a ativação de macrófagos e dos linfócitos T e B, ocasionando a produção de anticorpos (Bach et al, 2002).

Uma das principais alterações envolvidas na suscetibilidade do desenvolvimento desta patologia são as alterações referentes aos antígenos leucocitários humanos (HLA). Atribuindo-se 50% de sua hereditariedade a mutações referentes a esse gene (Noble and Valdes, 2011). Importantes marcadores são imprescindíveis no diagnóstico desta doença, e nesse cenário os anticorpos anti-insulina (IAA) são considerado um dos mais eficazes marcadores para diagnóstico em crianças menores de 5 anos. Entretanto, em idades mais avançadas o IAA perde sua sensibilidade. Nesse contexto, através de estudos foi estabelecido como o mais sensível e eficiente na detecção do DMI os anticorpos contra a descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD65) (Barinas-Mitchell, et al, 2006).

1.4 DIABETES *MELLITUS* DO TIPO II

O DMII comete cerca de 90 a 95% dos casos de todos os pacientes diagnosticados com diabetes. Os indivíduos apresentam níveis plasmáticos de glicose em jejum em torno de 140mg/dL. Esse aumento da glicemia é ocasionado como consequência da resistência a insulina fazendo com que a recaptação de glicose ocorra de forma ineficiente.

O mecanismo de transporte de glicose é imprescindível para o funcionamento de diversos tipos celulares que necessitam de energia (ATP), para desempenhar suas funções fisiológicas. Entretanto, o excesso dos níveis plasmáticos desencadeia processos patológicos.

A insulina é um essencial hormônio para o controle glicêmico. De modo que, os processos deletérios ocasionados pela hiperglicemia como: acúmulo de lipídios, estresse oxidativo e liberação de citocinas pró-inflamatórias interferem em sua sinalização, através da dessensibilização de seus receptores.

Hábitos alimentares, assim como o sedentarismo estão relacionados com o desenvolvimento e progressão desta doença. Por se tratar de hábitos de vida, comumente aparece em idades tardias, podendo ou não estar associado à obesidade (Israili, 2011).

1.5 CARDIOMIOPATIA DIABÉTICA

Cardiomiopatia diabética foi um termo introduzido por Rubler e colaboradores e posteriormente adotado pelos clínicos. Caracteriza-se por mudanças estruturais e funcionais do miocárdio e que não estão diretamente associadas a doenças da artéria coronária (DAC) ou hipertensão (Voulgari, et al, 2010).

Nesse contexto, as complicações ao longo prazo decorrentes do DM levam a acometimentos macrovasculares e microvasculares. Sendo demonstrada através do estudo de Framingham a relação entre DCV com o DM (Kengne, et al, 2010). Corroborando ainda com esses achados um trabalho publicado por Almoróset al (2017), mostrou que 65% dos pacientes diabéticos morrem devido a disfunções cardíacas.

Esse desequilíbrio metabólico decorrente da hiperglicemia e hiperlipidemia afeta principalmente o miocárdio, podendo levar a morte de cardiomiócitos e fibrose intersticial, além de ocasionarem estresse oxidativo, afetando a homeostase de íons no meio intracelular, em especial o Ca^{2+} . O que pode acarretar em comprometimento funcional do coração (Dietl e Maack, 2017).

Alterações estruturais cardíacas são comumente encontradas em pessoas acometidas pelo DM. Inicialmente é possível detectar disfunção diastólica assintomática e com a progressão, os pacientes tendem a desenvolver insuficiência cardíaca (IC). Nos estágios mais avançados da doença pode-se observar disfunção sistólica (Adeghate *et al.*, 2010).

Além das alterações mecânicas já descritas, são observadas alterações elétricas nos corações de pacientes diabéticos. Sendo demonstrado um alargamento do intervalo QT e QTc do ECG. Esse aumento na repolarização ventricular geralmente é associado a neuropatia autonômica e evidenciado em pacientes com DMI segundo Winston e col 1997. Deste modo, tanto o aumento do intervalo QT quanto a presença de

pós-potências tardios podem ser considerados preditores para desencadear arritmias cardíacas e subsequente morte súbita (Niemeijer *et al.*, 2015; Suys, *et al* 2006; Rana *et al.*, 2005).

Diabetes Mellitus e o sistema imune inato

1.6 HIPERGLICEMIA E SISTEMA IMUNE INATO

O processo inflamatório é um mecanismo fisiológico onde visa a eliminação de patógenos ou mediação dos sinais endógenos, como dano celular. Através da inflamação pode-se estabelecer a homeostasia do organismo e reparação tecidual, entretanto o aumento da resposta inflamatória gera um desequilíbrio metabólico proporcionando processos patológicos (Libby, Ridker e Hansson, 2009).

Nesse sentido, o DM ocasiona uma desordem metabólica e subsequente desregulação do sistema imunológico. Estabelecendo um processo denominado de inflamação estéril (sem patógeno) ocasionando a secreção de padrões moleculares associados a danos (DAMPS).

Na inflamação estéril, DAMPS como proteína 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1), proteínas de choque térmico (HSPs), assim como alarminas (S100A8, S100A9) são liberados por macrófagos, monócitos e células dendríticas. Essas moléculas acentuam a resposta inflamatória através do recrutamento de células do sistema imune inato e produção de citocinas pró-inflamatórias, atuando na resolução da injúria (Nativel. B *et al*, 2013).

Outro importante mecanismo envolvido no desenvolvimento do DM são os produtos de glicação avançada (AGEs). Essas moléculas são intensamente formadas sob condições de hiperglicemia e estresse oxidativo(Fuentes *et al.*, 2016) e estabelecem alta toxicidade para as células-beta, contribuindo para a progressão do diabetes (Chuang. M. S. *et al*, 2013).

Além dos fatores já citados anteriormente, uma das funções atribuídas aos AGEs é o aumento da expressão do fator nuclear κ B (NF- κ B). Esse fator de transcrição está associado com o aumento de vias apoptóticas e modulação

nas expressões gênicas de importantes canais iônicos para o potencial de ação cardíaco (Panama. K. B. *et al.*, 2011).

1.7 HIPERGLICEMIA E ATIVAÇÃO DO EIXO TLR4/NLRP3/IL-1 β

Os altos níveis de glicose plasmáticos como já citado anteriormente levam a exacerbação da resposta inflamatória e secreção de citocinas pró-inflamatórias em pacientes diabéticos (Geerlings e Hoepelman, 1999).

Nesse contexto, moléculas relacionadas ao sistema imune inato como: macrófagos, células dendríticas e receptores de membrana do tipo *Toll like* (TLRs) são superexpressados. Sendo a nível cardíaco, os receptores *toll like receptor 2* (TLR2) e *toll like receptor 4* (TLR4) os mais estudados (Gupta. S *et al.*, 2017).

Subsequentemente à ligação dos DAMPS aos receptores do tipo TLRs, ocorre a ativação da via MyD-88 (molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88), que gera um aumento da atividade do NF- κ B, culminando no aumento da expressão gênica de pro IL-1 β , pro-IL-18 e NLRP3 (receptores do tipo *nod-like* contendo um domínio de pirina 3) (Liu *et al.*, 2016) (Versteeg. D. *et al.*, 2009).

A síntese e maturação dessas citocinas são dependentes de dois sinais. O sinal 1, ativando os TLRs aumentando a atividade do fator de transcrição NF- κ B, transcrevendo os genes pro- IL-1 β e pro-IL-18. O Sinal 2, ocorre através do efluxo de K⁺ e ativação dos receptores purinérgicos P2X7 (Zha *et al.*, 2016). Esse processo provoca a oligomerização das moléculas NLRP3, ASC (proteína *speck-like* associada à apoptose com domínio de recrutamento de caspase, PYCARD) e caspase-1(Casp-1), clivando essas pró-citocinas e secretando-as em sua forma ativa (Dasu *et al.*, 2008).

No entanto, o receptor TLR4 possui uma via não canônica denominada TRIF (adaptador contendo domínio “TIR” indutor de interferon β). Essa via culmina no fator de transcrição Interferon 3 (IRF3) exacerbando a expressão de mediadores inflamatórios (Troutman, *et al.*, 2012) (Figura 2).

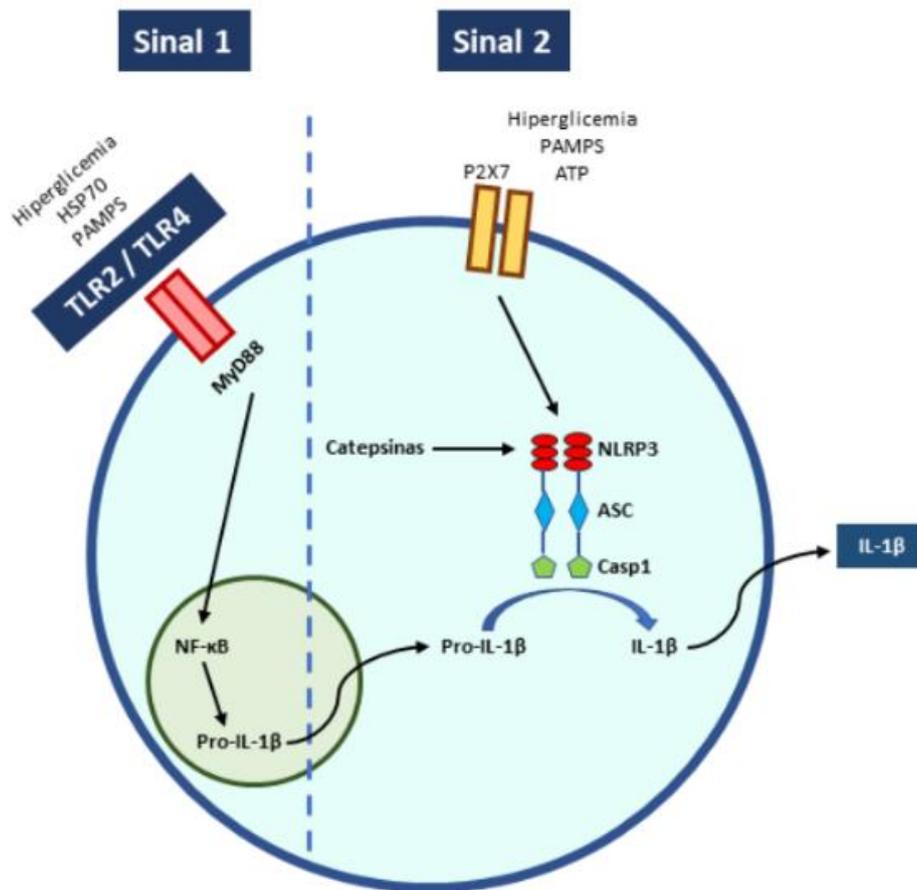


Figura 2 – Modelo de ativação do inflamossoma NLRP3 via TLR's e clivagem e liberação de IL-1β

Para a síntese e maturação de IL-1β são necessários dois sinais. O sinal 1 é proveniente da ativação dos receptores TLR's 2 e 4, culminando na ativação do NF-κB aumentando a síntese gênica de pro-IL-1β. O sinal 2 ocorre através de oligomerização das proteínas NLRP3, ASC e Casp1. Mediante a formação desse complexo protéico a pro-IL-1β é clivada em IL-1β, sua forma ativa.

1.8 PAPEL DO SISTEMA IMUNE INATO NAS ALTERAÇÕES ELÉTRICAS CARDIACAS

Ultimamente, já se tem estabelecido a influencia do sistema imune inato sobre a função elétrica cardíaca através da modulação de importantes canais iônicos, assim como a liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Como descrito anteriormente a maior atividade dos fatores de transcrição bem como a liberação de citocinas são dependentes de TLR's.. Esses receptores possuem ação direta na síntese de citocinas pró-

inflamatórias, além de aumentarem as concentrações plasmáticas de proteínas de shock térmico do tipo HSP, sendo essa proteína um ligante dos TLR's. De acordo com Monnerat, et al., 2017, em um modelo experimental de DMI, o silenciamento gênico de TLR2 foi capaz de prevenir as alterações elétricas cardíacas assim como a suscetibilidade a arritmias. Por outro lado, a ativação de outro importante receptor da imunidade inata, o TLR4 promove um aumento da duração do potencial de ação a 90% (APD90), mostrando-se potencialmente arritmogênico através do aumento da atividade deflagrada e pós-potenciais tardios. Essas alterações possivelmente são explicadas pela diminuição da corrente de saída de potássio (I_{to}), através da modulação gênica ocasionada pela ativação da via acessória TRIF (Monnerat, et al., 2014) (Figura 3).

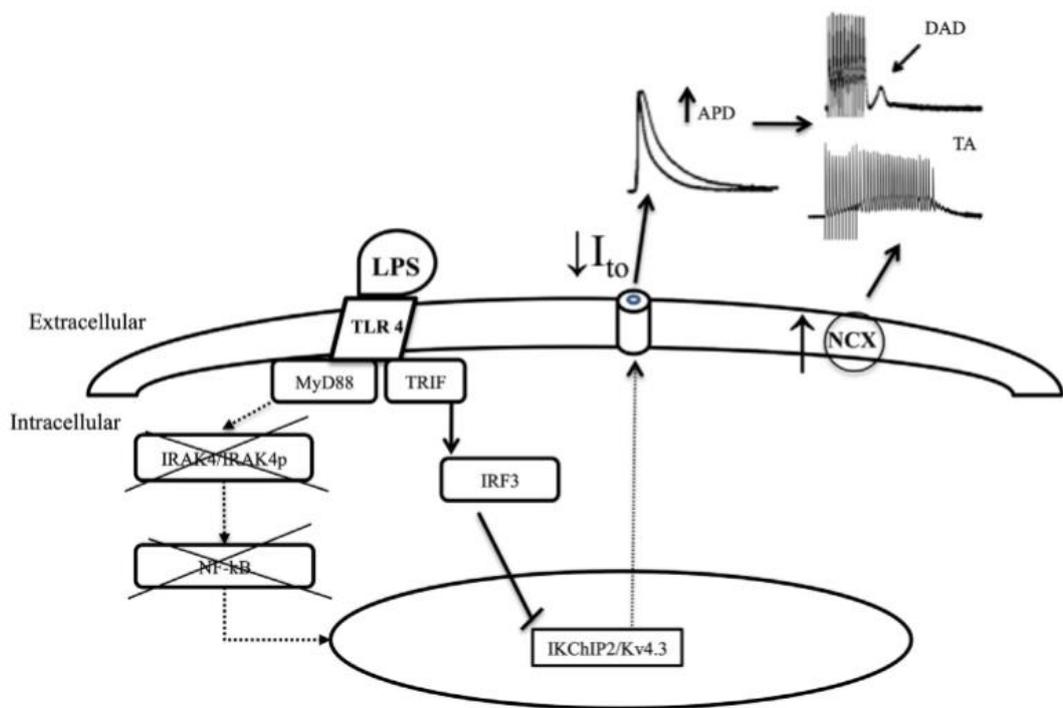


Figura 3 - Mecanismos propostos mediante a ativação dos receptores TLR4

O receptor TLR4 é ativado através do seu agonista LPS. Essa ativação é mediada pela via acessória TRIF, culminando em seu fator de transcrição IRF3, modulando a atividade gênica dos canais de K^+ transientes de influxo. Com a baixa atividade deste canal aumenta o APD90 favorecendo uma maior atividade do trocador NCX: Na^+/Ca^{2+} e o surgimento de pós potenciais e atividade deflagrada. Adaptado de Monnerat G 2014

Outro importante componente da imunidade inata envolvido nas vias apoptóticas é o NF- κ B. Esse fator de transcrição culmina no aumento de vias relacionadas ao estresse celular bem como modula a expressão gênica de canais iônicos em especial o I_{to} (Fernández-Velasco *et al.*, 2007). Durante o diabetes, ocorre o aumento dos processos inflamatórios sistêmicos, que refletem no aumento das concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias, tais como: TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Dogan *et al.*, 2006) (Monnerat *et al.*, 2016). Atualmente já se sabe que essas citocinas podem interagir diretamente com os cardiomiócitos, de modo que gere um remodelamento elétrico e subsequente arritmias cardíacas (Walley *et al.*, 2006) (Kawada *et al.*, 2006).

1.9 RESPOSTA SEXO ESPECIFICA NA IMUNIDADE INATA

Sabe-se que o gênero é um dos mais marcantes moduladores da resposta imune. De modo que, os hormônios sexuais estão envolvidos em diversas cascatas de sinalizações mediando a expressão gênica de diversos componentes imunes (Klein e Flanagan, 2016).

Os hormônios sexuais estão associados tanto a imunidade inata quanto a imunidade adaptativa. O estrogênio, principal hormônio feminino geralmente possui um efeito mais imunomodulador, ativando geralmente uma resposta Th2 e liberação de citocinas como: IL-6 e IL-10 possuindo um papel predominantemente anti-inflamatório (Beagley e Gockel, 2003). Por outro lado, a testosterona, hormônio de predominância masculina possui um efeito mais imunossupressor, ativando uma resposta Th1 (Girón-González *et al.*, 2000). Vale ressaltar que macrófagos de camundongos machos apresentam uma maior expressão de TLR4 e TLR2 diante a resolução de infecções em relação as fêmeas (Roberts *et al.*, 2012). Outra importante mediação hormonal relacionada ao estrogênio é a modulação de TLR8, que levam a um maior recrutamento de MyD88 e maior ativação de NF- κ B mediante a uma infecção viral (Melchjorsen *et al.*, 2005).

Nesse contexto, Alarcón MM (Alarcón, 2017) demonstrou que em um modelo murino de DMI a falta do TLR4 conseguiu prevenir de maneira sexo específica as alterações elétricas cardíacas, tendo as fêmeas diabéticas prevenindo o aumento do intervalo QJ bem como o aumento do APD90. Desse modo, parece que os hormônios sexuais femininos possuem a capacidade de interagir com receptores do sistema imune inato e assim gerar efeitos cardioprotetores.

1.10 DIMORFISMO SEXUAL E DIABETES

Além de mediar infecções, o gênero também é influenciador da resposta imune em diversas doenças, como no caso do diabetes. Sabe-se que a progressão desta enfermidade leva a acometimentos tanto macro e microvasculares (Regensteiner *et al.*, 2015). No DMII as mulheres apresentam maior susceptibilidade de desenvolverem DCV devido a fatores que levam à resistência a insulina em relação aos homens (Anand *et al.*, 2008). Enquanto no DMI as mortes ocasionadas por doenças cardíacas são semelhantes em ambos os sexos. Estando os fatores externos como tabagismo e estilo de vida influenciando na mortalidade desses pacientes (Patterson *et al.*, 2003).

Um dos principais agravantes relacionados ao DM são as disfunções endoteliais. Pacientes com DMII desenvolvem essa disfunção em estágios mais iniciais em comparação com os pacientes com DMI, que tendem a desenvolverem mais tardiamente (Bertoluci *et al.*, 2015) (Peters *et al.*, 2015). A discussão acerca da influencia do gênero nas alterações endoteliais no diabetes ainda é muito controversa. Mulheres no estágio de pré-menopausa apresentam uma grande vasodilatação quando comparado com homens em idades avançadas (Félétou e Vanhoutte, 2006). Entretanto no período pós-menopausa as mulheres apresentam uma queda abrupta de estrogênio perdendo a cardioproteção proveniente deste hormônio (Lee *et al.*, 2001).

As disfunções geradas ao endotélio em pacientes diabéticos levam a uma queda da produção da síntese de óxido nítrico endotelial (eNOS), através

da produção exacerbada de das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Haynes *et al.*, 2003). Essa produção de ROS favorece a um estresse celular culminando na liberação de citocinas pró-inflamatórias (Sena, Pereira e Seiya, 2013).

O estrogênio possui dois receptores nucleares, o receptor de estrogênio alfa (ER α) e receptor de estrogênio beta (ER β). Cai *et al.*, 2011, demonstrou que o ER β possui a capacidade de modular a translocação de GLUT4 para a superfície celular, e assim pode-se associar esse receptor de estrogênio com a homeostase da glicose.

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais de experimentação da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o protocolo de número:130/13, 131/13, 102/15 e 137/16. Veja com Micaela ou Ainhoa porque sei que já temos outros números de protocolos novos para estes estudos.

Para o desenvolvimento deste projeto, foram utilizados camundongos selvagens C57BL/6 de ambos os sexos entre 8 a 12 semanas (fornecidos pelo Bioterio Central da UFRJ) e camundongos transgênicos (*knockouts*) de corpo todo para TLR4 (provenientes da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, cedidos pelo Prof. Sergio Costa Oliveira). Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho na Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. Todos os camundongos utilizados neste estudo foram mantidos em condições controladas e estáveis de temperatura (22 °C) e com ciclo luz-escuro de 12 em 12 horas, com livre acesso à água e ração.

2.2 MODELO EXPERIMENTAL (Diabetes *Mellitus* do Tipo I)

O modelo de diabetes do tipo 1 foi estabelecido a partir de 5 (cinco) injeções consecutivas intraperitoneais de estreptozotocina (STZ) (50 mg/kg) diluídas em 300 µL de tampão citrato (pH 4,5). Foram considerados diabéticos aqueles animais que apresentaram glicemia igual ou superior a 250 mg/dL, mensurados pelo glicosímetro (Contour™ TS Bayer) após 8 semanas da administração da droga.

Para a realização deste trabalho utilizamos também animais NOD. Esses animais desenvolvem espontaneamente DMI (250 mg/dL) a partir da 14ª semana após o nascimento. Optamos por trabalhar somente com fêmeas, pois apresentam maior susceptibilidade de desenvolverem DMI em relação aos

machos. Considerados o padrão-ouro no estudo de DMI esses animais foram utilizados após 4 semanas da detecção de hiperglicemia. Os animais NOD desenvolvem de maneira espontânea DMI, promovidos por componentes imunológicos. Como controle experimental o Laboratório Jackson sugere a utilização de animais NOR, que são animais geneticamente modificados para criar uma resistência ao DMI.

2.3 MEDIDAS DE HIPERTROFIA CARDÍACA E UTERINA

Para avaliação da hipertrofia cardíaca, foram utilizadas as razões do peso do coração/peso corporal e peso do coração/comprimento da tíbia. Os animais foram pesados ao final do protocolo experimental e após eutanasiados pela técnica de deslocamento cervical. O coração foi extraído, lavado com PBS (tampão fosfato salino) 1X e secado em papel filtro para posterior pesagem. Para avaliação do comprimento da tíbia, foi utilizado um paquímetro.

Para medir a hipertrofia uterina, os animais foram eutanasiados e extraído o útero. Após a extração, o útero foi lavado em PBS 1X, secado em papel filtro e pesado em uma balança analítica de alta precisão (Ohaus – analyticalplus).

2.4 CIRURGIA DE OVARECTOMIA (OVX)

Os animais foram previamente anestesiados com isoflurano 1,5% em um fluxo de 1L/min de oxigênio. Posteriormente, realizou-se uma laparotomia. Com o auxílio de uma pinça e de fio de sutura de nylon (5.0 Shalon) as tubas uterinas foram amarradas e os ovários extraídos. Após a cirurgia, os animais receberam tramadol na dose de 10 mg/mL, a cada 12 h.

2.5 ELETROCARDIOGRAMA E TESTE DE VULNERABILIDADE A ARRITMIAS

Para a implantação de eletrodos subcutâneos, os animais foram previamente anestesiados com o anestésico isoflurano 1,5% em um fluxo de 1L/min de oxigênio. 24h após, foram realizados os registros de ECG na derivação DI durante 5 min com o animal acordado. No momento do registro, os conectores foram ligados por cabos flexíveis a um amplificador diferenciado (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 registrado pelo programa software Axoscope 9.0 (Axon Instruments, EUA). Foram analisados os parâmetros: RR, PR, Onda P, QRS e intervalo QJ. Optamos analisar o intervalo QJ, devido a que representa a despolarização precoce onde acontece a maior movimentação de cálcio nos cardiomiócitos de camundongos.

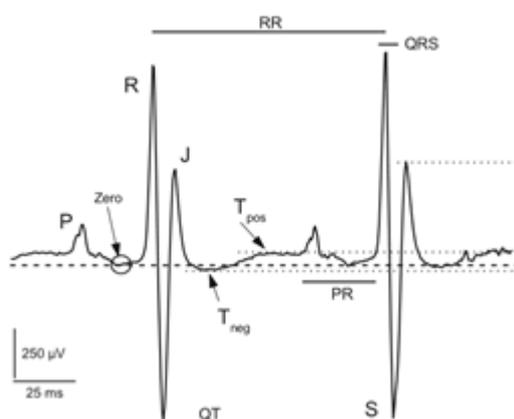


Figura 4 - Traçado representativo do eletrocardiograma em camundongo

Representação de um registro de eletrocardiograma obtido de um camundongo do grupo controle. Esse traçado mostra os parâmetros medidos neste trabalho

Para avaliar a suscetibilidade a arritmias, os animais foram primeiramente anestesiados com Xilazina (0,5 mg/g) e Ketamina (1,5 mg/g). Em seguida, um ECG controle foi gravado durante 5 min. Logo após, foi administrada cafeína (via i.p.) na dose de 120 mg/kg e também dobutamina na dose de 50 µg/kg/i.v. Após disto, um novo ECG foi registrado durante 15 min. O índice de *score* de gravidade de arritmia foi estabelecido conforme a seguir: 0 = ausência de eventos arrítmicos durante o teste; 1 = contrações ventriculares prematuras; 2= presença de bigeminismo; 3 = taquicardia ventricular (VT) e 4 = fibrilação ventricular. Os registros foram analisados com o auxílio do programa LabChart 7.3 (ADInstruments).

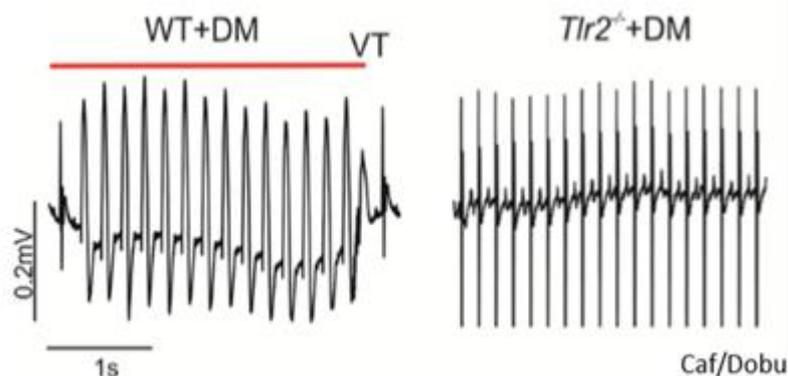


Figura 5 - Traçado representativo durante indução de arritmia utilizando Cafeína e Dobutamina. Traçado representativo durante o protocolo de arritmia através da administração de cafeína e dobutamina. A linha vermelha demonstra uma taquicardia ventricular. Na figura ao lado observa-se um traçado controle. (adaptado de Monnerat. G et al, 2017)

2.6 ANÁLISES MOLECULARES

O RNA total foi extraído usando o kit RNaseFibrousTissue (Qiagen) seguindo as orientações do fabricante. A determinação da concentração de RNA total nas amostras foi realizada por medida de absorbância em comprimento de onda de 260 nm (A260), utilizando um espectrofotômetro (NanoDrop, ThermoScientific). Foi possível estimar a pureza do RNA por meio das relações A260:A280 e A260:A230 para identificação de contaminantes. As amostras que apresentaram relação A260:A280 entre 1,80 e 2,0 e a relação

A260:A230 entre 2,0 e 2,2 foram consideradas. O RNA total foi estocado à -80 °C.

A Transcrição Reversa do mRNA (1000 ng/μl) foi realizada utilizando o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA complementar (cDNA) obtido através de 4 ciclos: 1º ciclo de 25°C durante 10 min, 2º ciclo 37°C por 120 min, 3º ciclo 85°C a 5 min e 4º ciclo a 4°C infinito. Após o cDNA foi estocado à -20°C.

O cDNA resultante da reação de transcrição foi usado como molde para a realização da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR). A qPCR foi realizada utilizando o termociclador de tempo real ViiA7 (Applied Biosystems). Foram utilizadas sondas TaqMan (Applied Biosystems, USA) para os seguintes genes: ERα (Mn 00433149-m1), GPER (Mn 02620446-s1), TLR4 (Mm-00445273_m1) e 18s (Mn 03928990_g1), este último foi utilizado como controle endógeno. A reação foi realizada com TaqMan Fast Universal PCR Master Mix, no AmpErase (Cat. #4352042). O programa utilizado foi 50°C 2min, 95°C 20seg, 40 ciclos 95°C 1seg, 60°C 20seg. A expressão quantitativa dos genes de interesse foi determinada pelo método comparativo Ct, utilizando a fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, onde Ct é referente ao "threshold cycle". O ΔCt foi determinado como a subtração do Ct do gene alvo e o Ct do gene controle (18s). O $\Delta\Delta Ct$ foi definido como a diferença entre o ΔCt de cada amostra de interesse com a média do ΔCt do grupo usado como controle. O "fold-change" da expressão do gene alvo foi calculado como a média \pm SEM do $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ para os grupos experimentais.

2.7 Análise Estatística

Para a análise estatística desse trabalho foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0. Todos os valores foram apresentados com média \pm erro padrão da média (EPD). Foram utilizados os testes t-student não pareado e One-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey para comparação entre todos os grupos. O valor $p < 0.05$ foi considerado significativo.

Capitulo I

ESTUDO DA ATVIDADE ELÉTRICA CARDÍACA NO MODELO
DE DIABETES MELLITUS DO TIPO I EM ANIMAIS NOD

3. HIPOTESE DO TRABALHO I

O DMI em animais NOD leva a um remodelamento elétrico cardíaco, refletido nas alterações das ondas eletrocardiográficas.

4. OBJETIVO GERAL DO TRABALHO I

Estudar as principais alterações eletrocardiográficas em animais NOD

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Estudar as alterações biométricas e metabólicas do modelo NOD

Avaliar as principais alterações do ECG geradas pelo DMI

Avaliar a vulnerabilidade à arritmias em animais NOD

5. RESULTADOS

Ao longo dos anos diferentes modelos animais foram propostos e utilizados visando aprofundar os conhecimentos no diabetes do tipo 1. Um dos modelos considerados como “padrão ouro” é obtido por modificações gênicas gerando um modelo muito semelhante ao achado em humanos. Os animais NOD desenvolvem diabetes a partir da 14ª semana após seu nascimento. Nesse sentido, nosso desenho experimental consiste em utilizar os animais 4 semanas após a detecção de hiperglicemia. Os animais NOD apresentaram aumento da concentração de glicose no sangue quando comparados o seu respectivo controle, animais NOR, bem como os animais induzidos por STZ (Figura 6, a). O peso corporal foi mensurado ao final do protocolo experimental e não foi observada diferença significativa em ambos os grupos experimentais (Figura 6, b). Como parâmetro biométrico para avaliar o índice de hipertrofia cardíaca utilizou-se a razão peso do coração sobre o comprimento da tíbia. Os animais NOD apresentaram uma diminuição dessa razão, comparado ao seu controle experimental, bem como pode-se notar uma diminuição desse índice em relação ao modelo experimental por indução de STZ (Figura 6, c).

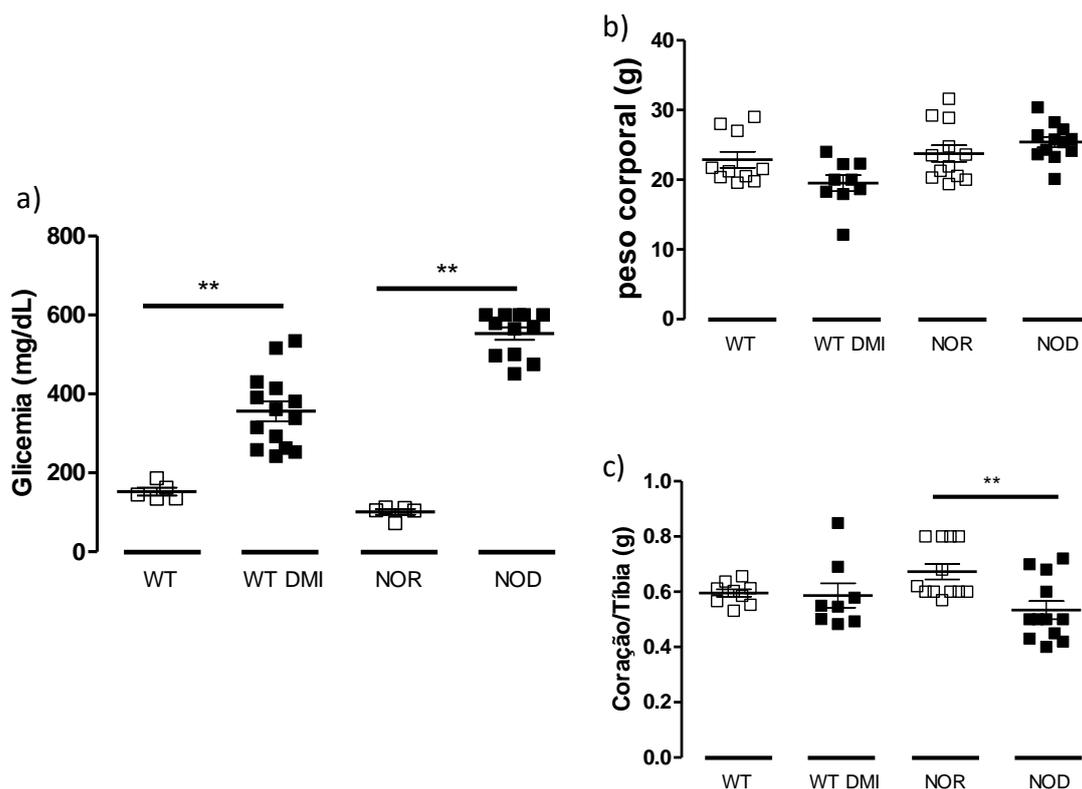


Figura 6– Animais NOD apresentam aumento da concentração de glicose no sangue

Aumento da concentração de glicose no sangue (a). Peso corporal dos grupos experimentais (b). Índice de hipertrofia cardíaca (c). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. **p < 0,01 vs WT CNTRL, **p < 0,01 vs NOR.

Para investigar os efeitos da DMI na função elétrica cardíaca, foi realizado o ECG *in vivo* nos 4 grupos experimentais. A partir do traçado médio foram medidos os parâmetros eletrocardiográficos. Os animais NOD não apresentaram alteração na frequência cardíaca refletida pelos valores semelhantes no intervalo RR (Figura 7, a). Na condução átrio-ventricular observamos um aumento da duração do tempo deste nos NOD em relação ao seu próprio controle e ao modelo de STZ, esse aumento é observado através do intervalo PR (Figura 7, b). A duração da despolarização atrial é mensurada através da Onda P, nesse parâmetro os animais NOD apresentaram aumento na duração quando comparado ao seu controle (Figura 7, c). No complexo QRS não foi observada nenhuma alteração nos grupos experimentais (Figura 7, d). A análise dos registros mostrou que os animais do grupo NOD apresentaram um maior intervalo QJ, quando comparado ao seu respectivo

controle, indicando possíveis alterações na repolarização ventricular (Figura 7, e). Esses dados sugerem que o modelo NOD gera alterações no perfil elétrico desses corações.

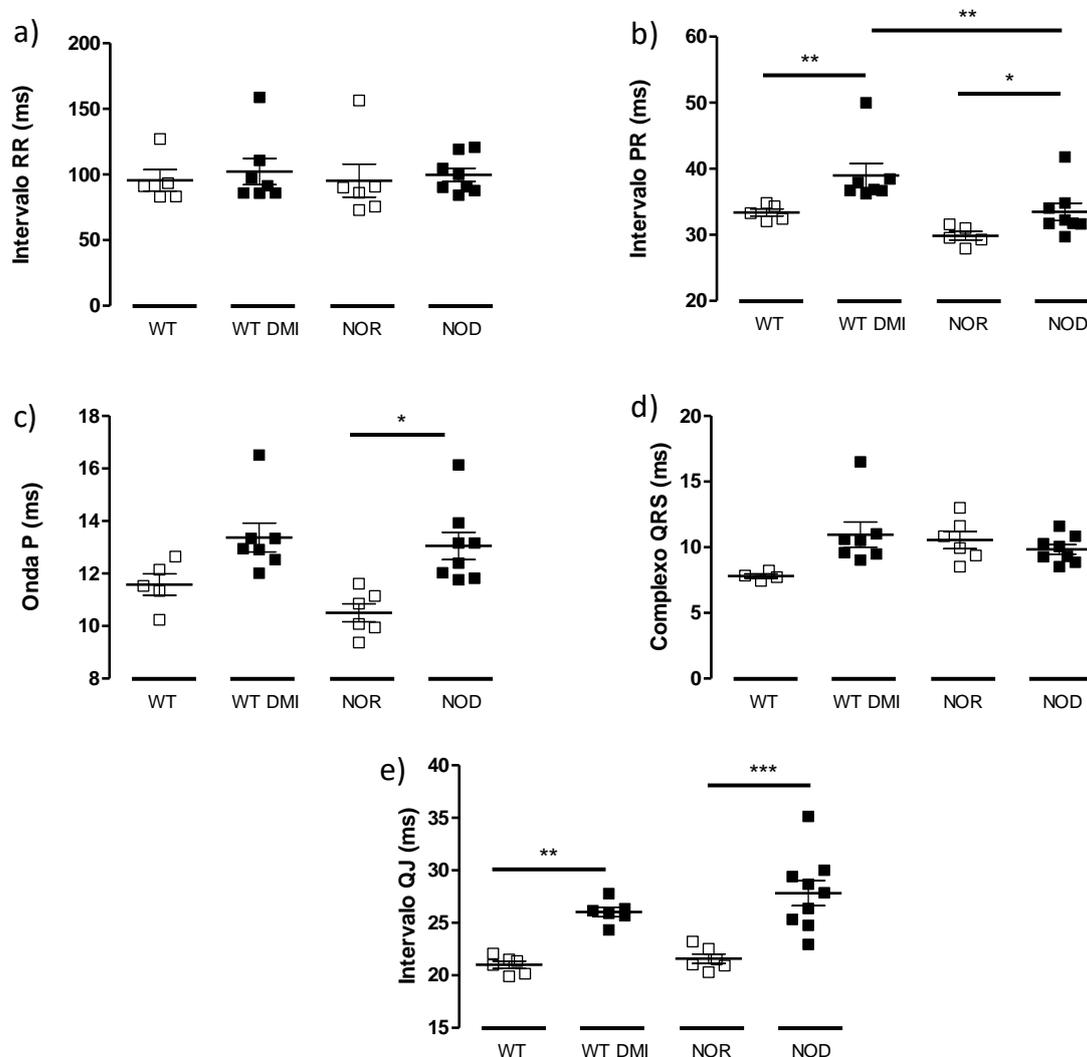


Figura 7 – O modelo NOD gera um remodelamento elétrico cardíaco

Os gráficos acima apresentam os parâmetros elétricos cardíacos: (a) frequência cardíaca, refletida através do intervalo RR. (b) Tempo de condução átrio-ventricular, intervalo PR. (c) Despolarização atrial, onda P. (d) Despolarização ventricular, Complexo QRS. (e) Intervalo QJ, avaliativo da função elétrica ventricular. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs NOR; ** $p < 0,001$ vs WT CNTRL; ** $p < 0,01$ vs WTDM; *** $p < 0,01$ vs NOR.

Um dos parâmetros aqui analisados, o intervalo QJ, é amplamente utilizado como preditor de eventos arritmogênicos. Assim, uma duração maior nele pode sugerir uma maior predisposição à arritmias ventriculares. Para o

estudo do potencial arritmogênico, camundongos de todos os grupos experimentais foram submetidos ao protocolo de estimulação com cafeína e dobutamina *in vivo*. Após 15 minutos, foram avaliadas a severidade e susceptibilidade arritmogênica nesses animais. Observa-se que os animais NOD apresentam maior vulnerabilidade a arritmias em relação ao seu próprio controle NOR. Esse aumento também pode ser observado nos animais WTDMI em relação ao seu respectivo controle WT. Esses dados indicam que semelhante com o modelo de DMI induzido por STZ o modelo desta doença nos animais NOD também apresentam maior suscetibilidade a arritmias (Figura 8).

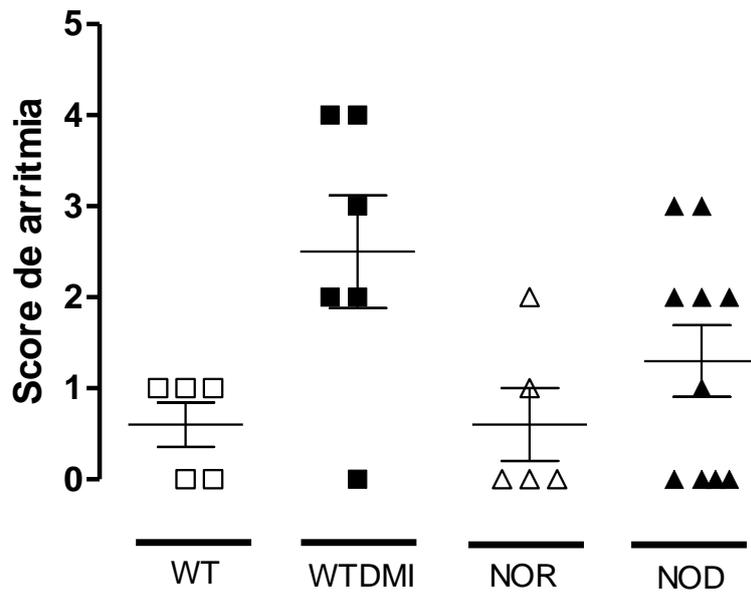


Figura 8 – Animais NOD apresentam maior vulnerabilidade a arritmias

Score de arritmias dos 4 grupos experimentais. Os símbolos vazios simbolizam os controles e os símbolos cheios os grupos experimentais. 0 = ausência de eventos arrítmicos durante o teste; 1 = contrações ventriculares prematuras; 2= presença de bigeminismo; 3 = taquicardia ventricular (VT) e 4 = fibrilação ventricular.

6. Discussão I

O DMI é um distúrbio metabólico que afeta diversos órgãos e sistemas. A longo prazo essa doença desencadeia alterações cardiovasculares, ocasionadas através do remodelamento funcional e elétrico, podendo levar a morte súbita dos indivíduos acometidos.

Nesse contexto, alguns modelos experimentais de DMI foram desenvolvidos para ajudarem a compreender melhor a fisiopatologia desta doença. Dentre os modelos experimentais, podemos destacar os modelos induzíveis farmacologicamente como o de STZ e modelos geneticamente modificados como no caso dos animais BB (Biobreeding) e NOD.

Os animais NOD são considerados o padrão ouro no estudo sobre DMI, pois, além de possuir baixo custo, eles recapitula o componente autoimune, precário ou até mesmo ausente nos modelos de indução de diabetes do tipo I por drogas. Esses animais desenvolvem de maneira espontânea o DMI, sendo então mais fidedignas as alterações encontradas nestes quando comparadas as alterações ou comorbidades encontradas em humanos.

A partir da 14ª semana os animais NOD começam a desenvolver o aumento sério de glicose no sangue, e mediante a detecção de hiperglicemia deixamos esses animais mais quatro semanas até o início do experimento, tempo considerado suficiente para observar alterações eletrocardiográficas. No decorrer da experimentação observamos que as fêmeas possuem maior suscetibilidade de desenvolver DMI do que os machos. Por esse motivo optamos por trabalhar somente com fêmeas.

Uma vez estudado os parâmetros biométricos e metabólicos do modelo, fomos investigar a atividade elétrica nesses camundongos através da técnica de eletrocardiograma *in vivo*. Nossos resultados demonstraram que os animais NOD apresentaram um aumento do intervalo PR. Esse prolongamento da condução atrioventricular pode ser caracterizado por um aumento da disfunção endotelial. Considerada uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em pacientes DMI,

o comprometimento da função endotelial leva a uma rigidez arterial (Bertoluci, 2015). Um estudo de Crisel e colaboradores (2011) demonstraram uma correlação de pessoas com doenças coronarianas instáveis com o aumento de bloqueios atrioventriculares (Crisel *et al.*, 2011).

Outro importante fator estabelecido é que o aumento do intervalo PR poderia estar envolvido com o aumento do risco de fibrilação atrial, a arritmia mais comum encontrada em pacientes diabéticos. Entretanto, essa correlação não é tão específica quanto o aumento da Onda P, dado que também obtivemos em nosso estudo (Smith *et al.*, 2017).

O intervalo QJ do eletrocardiograma em camundongos reflete a repolarização precoce ventricular. Gussak e colaboradores (2000) demonstraram que um aumento nesse intervalo estaria ligado a uma diminuição da densidade da corrente I_{to} . Nossos dados demonstraram que os animais NOD, apresentaram esse aumento de QJ. Essa alteração poderia ocasionar uma maior predisposição a eventos arrítmicos tal como estaria relacionada com a morte súbita em pacientes DMI (Kahn, Sisson e Vinik, 1987).

Sabe-se que as arritmias atriais como a fibrilação atrial são as arritmias mais comuns em pacientes diabéticos, porém, não são tão severas quanto as arritmias ventriculares. Por esse motivo optamos somente por analisar as arritmias ventriculares. Através do protocolo amplamente utilizado de caff/dob fomos avaliar a vulnerabilidade de arritmias nesses animais. Foi observado que os animais NOD apresentaram maior severidade nos eventos quando comparados a seu próprio controle, NOR. Já, ao fazermos uma análise comparativa com os animais induzidos por STZ observamos uma maior susceptibilidade em relação aos NOD. Em parte, a predisposição as arritmias ventriculares podem estar associadas a neuropatia autonômica diabética (NAD). De modo que ocorra uma diminuição do tônus parassimpático aumentando a atividade simpática, favorecendo o surgimento de arritmias (Weston and Gill, 1999). Essa hipótese ainda pode ser mais fortemente embasada através da correlação entre intervalo QT e NAD, segundo Bellavere e colaboradores (1988). Apesar de nossos resultados terem demonstrado aumento do QJ em camundongos e alguns animais apresentarem arritmias ventriculares, o tempo

de diabetes pode não ter sido o suficiente para reproduzir tais alterações em nível neurológico. Para avaliar melhor a predisposição a arritmias serão necessário experimentos mais complexos com intuito de avaliar a disponibilidade intracelular do Ca^{2+} , bem como a estimulação elétrica desses corações.

7. CONCLUSÕES I

Os animais NOD fêmeas apresentaram um aumento dos níveis séricos de glicose assim como, aumento do índice de hipertrofia cardíaca. No estudo eletrocardiográfico observamos um aumento do intervalo PR e do intervalo QJ. Na avaliação do score de arritmias, não podemos tirar conclusões devido a grande dispersão dos resultados.

Capítulo II

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO TLR4 NAS ALTERAÇÕES ELÉTRICAS CARDÍACAS OCACIONADAS PELA RESPOSTA SEXO-ESPECÍFICA EM UM MODELO DE DIABETES TIPO I

8. Hipótese de trabalho II

A hipótese desse trabalho é que a ativação do TLR4 através do DMT1 regule a ação dos receptores para estrogênio, de forma sexo dependente, induzindo remodelamento elétrico cardíaco.

9. Objetivo geral da proposta II

O objetivo geral desse trabalho é avaliar como a ativação do TLR4 através da DMI pode estar envolvida no remodelamento elétrico cardíaco e na gênese de arritmias em ambos os sexos.

9.1 Objetivos específicos

1. Estudar o papel da ativação do TLR4 no remodelamento elétrico cardíaco no modelo de T1D dos corações através do perfil do ECG;
2. Avaliar a incidência e severidade de arritmias em todos os grupos experimentais através da indução de arritmias pelo protocolo de dobutamina/cafeína;
3. Avaliar o efeito do Diabetes *Mellitus* do tipo I sobre a expressão gênica dos receptores TLR4 no tecido cardíaco de ambos os sexos.
4. Avaliar a expressão gênica dos receptores para estrogênio no coração.
5. Investigar o *crossstalk* entre os receptores TLR4 e os receptores de estrogênio na modulação da atividade elétrica através da técnica de ECG.

10. RESULTADOS

A hiperglicemia é característica principal encontrada em pacientes diabéticos. Para simular essa patologia, camundongos jovens de 8 semanas foram induzidos com 50mg/kg/dia de STZ durante 5 dias consecutivos. A STZ possui um efeito citotóxico para as células beta-pancreáticas levando a uma redução da massa celular e produção ineficaz de insula. Esse processo resulta em aumento dos níveis plasmáticos de glicose. Como pode-se observar após 8 semanas de indução com STZ os camundongos machos apresentaram o aumento da glicemia quando comparados aos seus respectivos controles. Esse resultado valida o nosso modelo de estudo sobre DMI (figura 9, a). Ao final do protocolo experimental os animais foram pesados e ambos os grupos não apresentaram diferenças estatísticas referentes à massa corporal (Figura 9, b). No que diz a hipertrofia cardíaca (Figura 9, c-d) foram utilizados dois parâmetros e em ambos não foram encontradas diferenças.

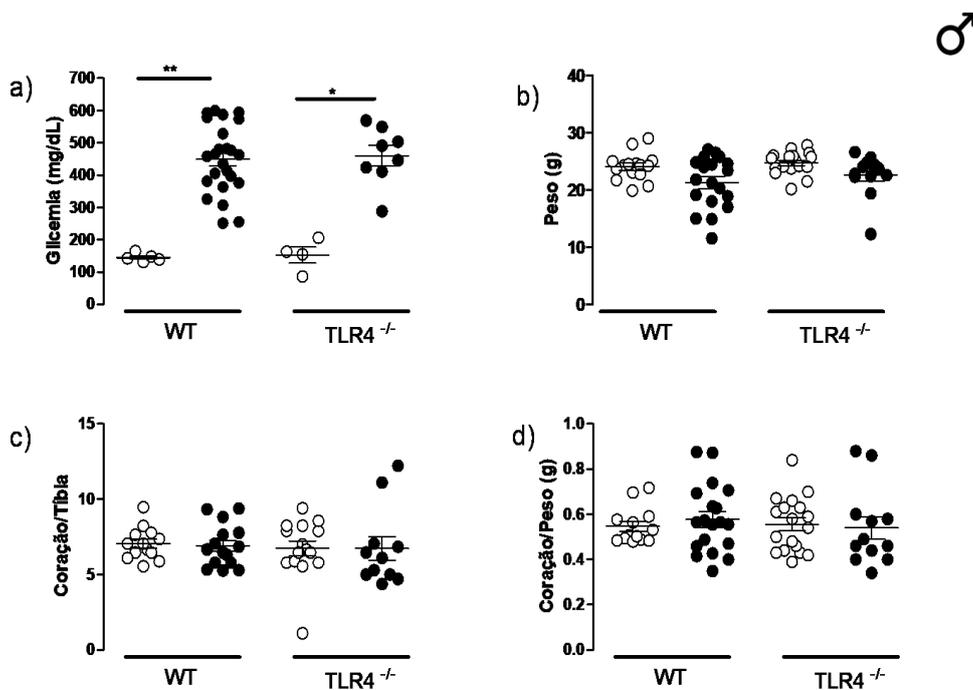


Figura 9 - O TLR4 não está envolvido nas alterações biométricas e metabólicas em camundongos machos

Glicemia mensurada na semana 8 nos grupos WT e Tlr4^{-/-} (a). Peso corporal dos grupos experimentais (b). Relação peso do coração/comprimento da tibia – índice de hipertrofia cardíaca (c). Relação peso do coração/peso corporal – índice de hipertrofia cardíaca (d). Valores expressos como média ± erro padrão da média; **p*<0,05 *Tlr4* versus *TLR4 DM*, ***p*<0,01 *WT* versus *WTDM*.

A fim de estabelecer a diferença entre os gêneros separamos os resultados em machos e fêmeas. Em machos observou-se que o TLR4 não participa das alterações metabólicas e biométricas. Deste modo, através do mesmo protocolo experimental fomos investigar os mesmo parâmetros nas fêmeas. Resultados demonstram que após 8 semanas de indução com STZ em camundongos fêmeas de ambos os grupos experimentais, apresentaram aumento da glicemia quando comparados com seus respectivos controles, caracterizando o desenvolvimento de DMI (Figura 10, a). Não houve diferença significativa no peso corporal entre os grupos (Figura 10, b). Também não foi encontrada diferença significativa nos parâmetros utilizados para mensuração da hipertrofia cardíaca (peso corporal/comprimento da tibia e peso do coração/peso corporal) (Figura 10, c-d).

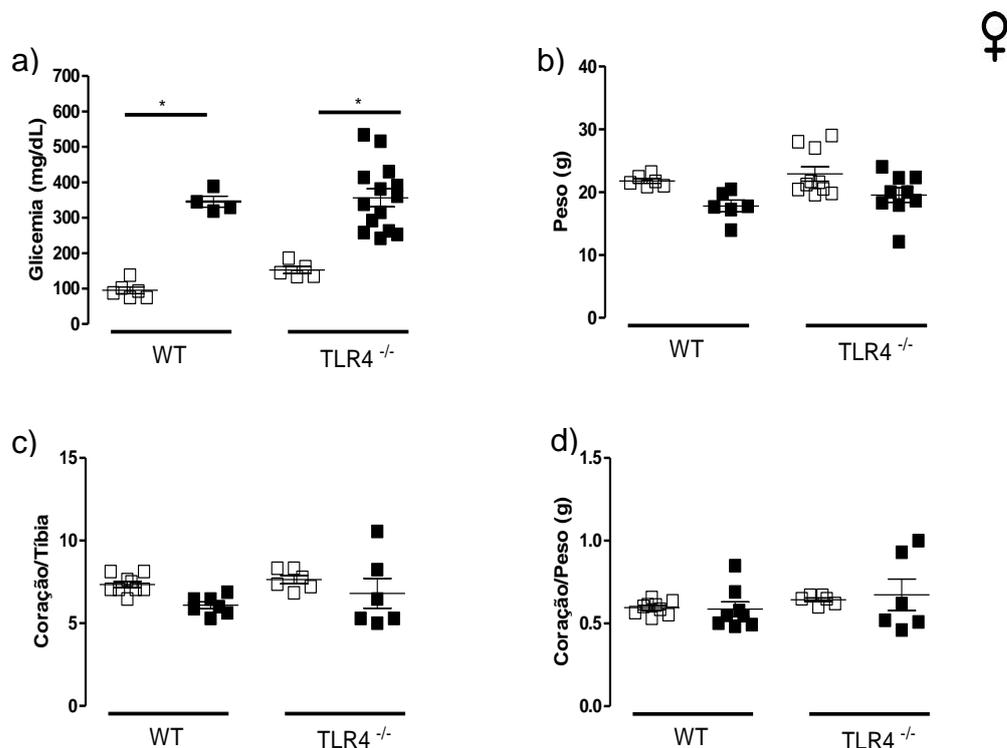
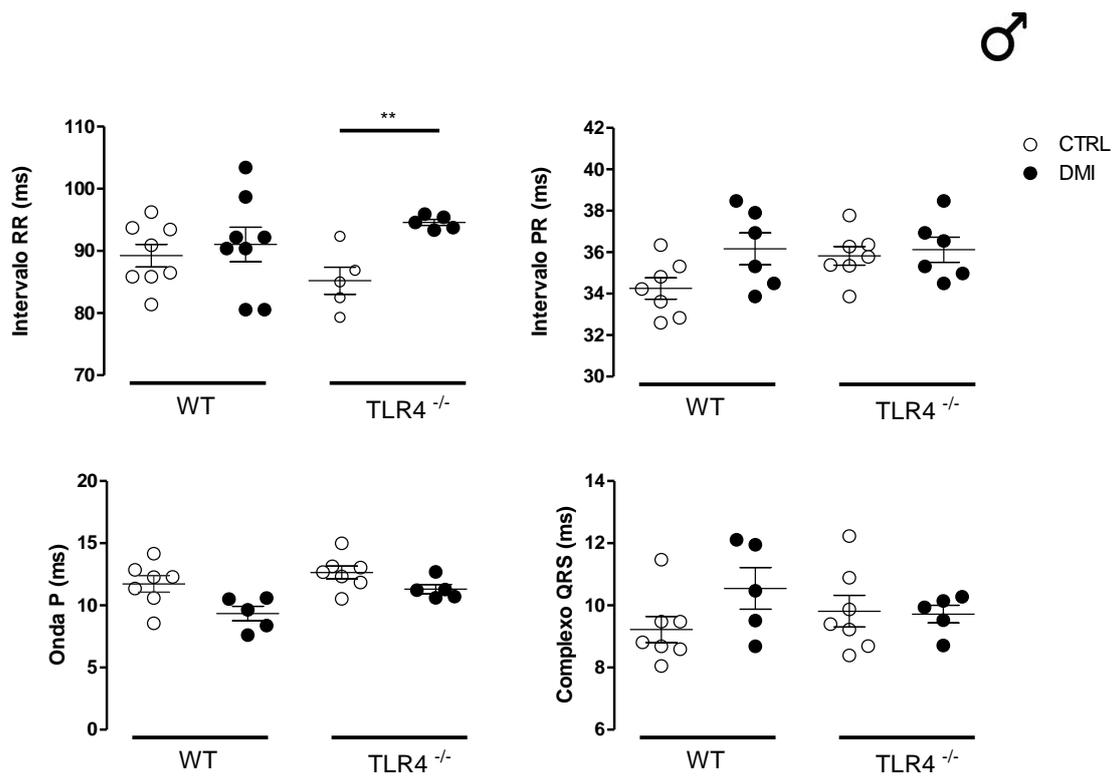


Figura 10 - O TLR4 não está envolvido nas alterações biométricas e metabólicas em camundongos fêmeas

Glicemia mensurada na semana 8 nos grupos WT e TLR4^{-/-} (a). Peso corporal dos grupos experimentais (b). Relação peso do coração/comprimento da tíbia – índice de hipertrofia cardíaca (c). Relação peso do coração/peso corporal – índice de hipertrofia cardíaca (d). Valores expressos como média ± erro padrão da média; **p*<0,05 diabético *versus* seus respectivos controles.

Tendo os pacientes diabéticos alterações em seu eletrocardiograma, fomos investigar em nossos animais de maneira sexo-específico quais as principais alterações elétricas cardíacas ocasionadas no modelo de DMI. A figura 11 demonstra os parâmetros eletrocardiográficos realizados *in vivo* em animais WT e *knockout* para o gene TLR4. Os resultados indicam que houve alteração no intervalo RR no grupo TLR4^{-/-} DMI em relação ao seu próprio controle (Figura 11, a). Não foram encontradas diferenças significativas no intervalo PR, parâmetro usado para determinar a duração da propagação do impulso elétrico até o nodo-atrioventricular (Figura 11, b). O intervalo de tempo relativo a despolarização atrial (onda P) foi similar em todos os grupos (Figura 11, c). Do mesmo modo, não houve diferença significativa entre os grupos na análise do complexo QRS, indicando que a hiperglicemia ou a deleção do gene para o TLR4 não alteraram os parâmetros eletrocardiográficos analisados (Figura 11, d). Contudo, podemos observar que no nosso modelo de estudo de DMI, os animais machos de ambos os grupos apresentaram aumento do intervalo QJ quando comparados com seus respectivos controles (Figura 11, e).



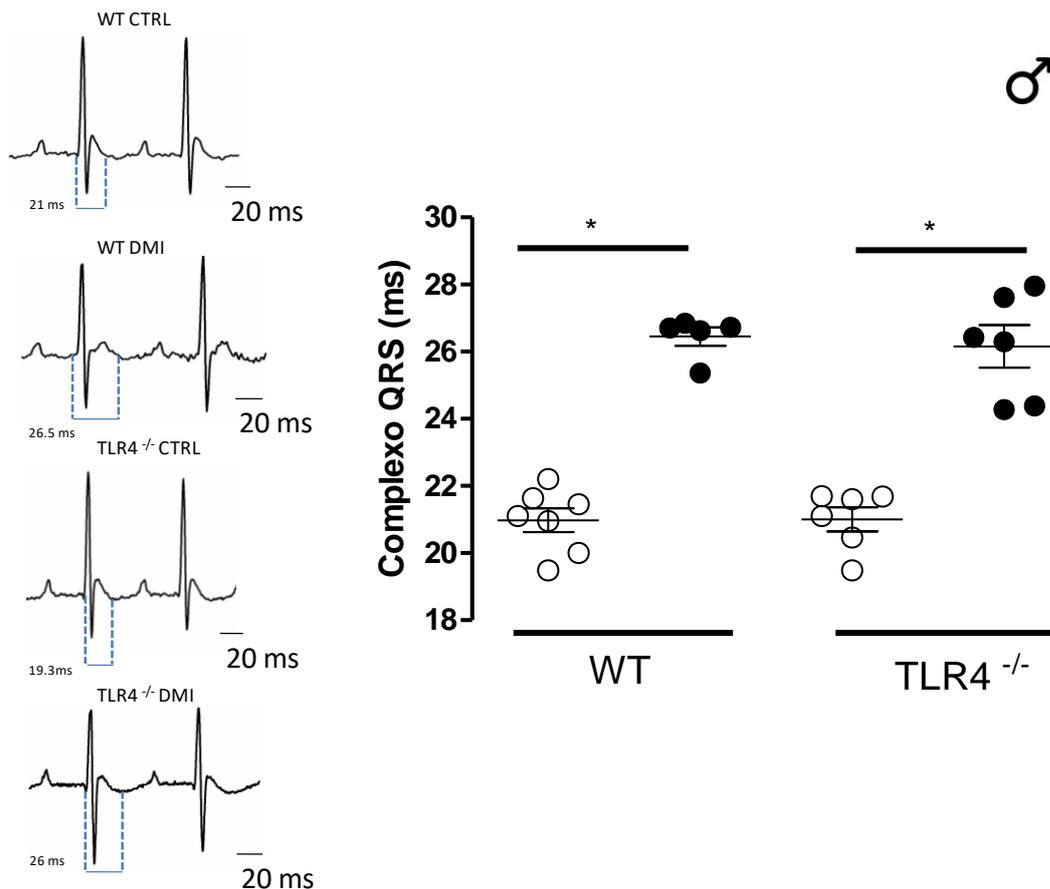
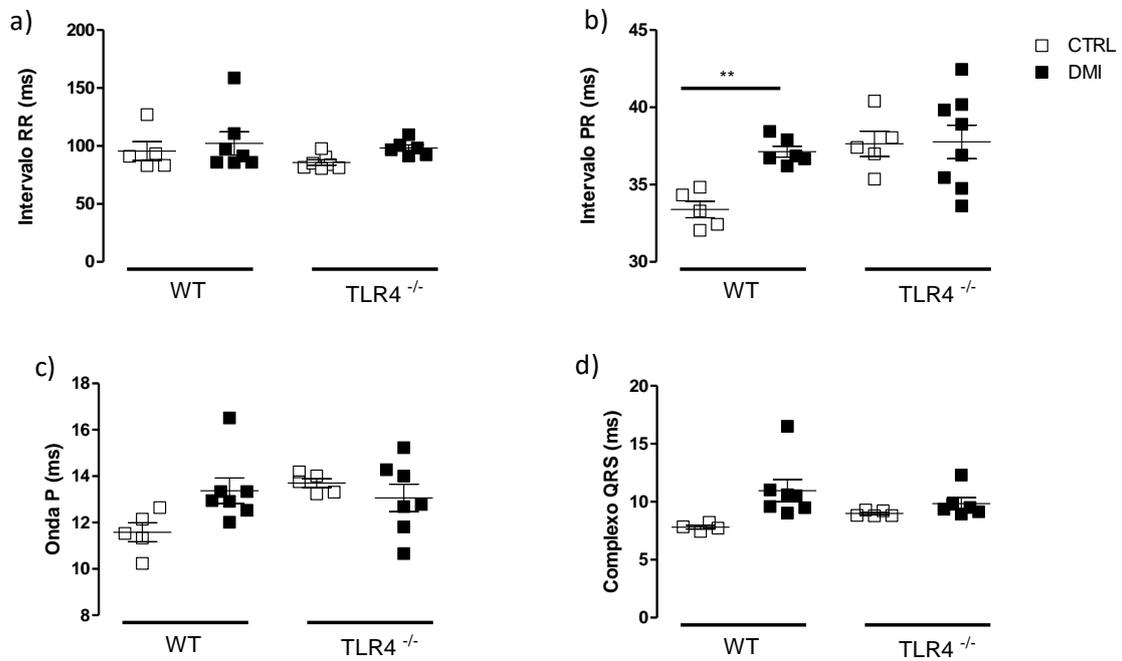


Figura 11 – A falta de TLR4 em camundongos machos não preveniu o aumento do intervalo QJ.

Parâmetros analisados do ECG na derivação D1 em camundongos machos. Frequência cardíaca, intervalo RR (Figura 12, a); condução átrio-ventricular, intervalo PR (figura 12, b); despolarização atrial, onda P (figura 12, c); despolarização ventricular, complexo QRS (figura 12, d). Traçados representativos dos 4 grupos experimentais e intervalo QJ (figura 12, e).

Tendo avaliado os parâmetros elétricos em machos, fomos observar em fêmeas se o DMI leva a um remodelamento elétrico cardíaco. Os resultados demonstram que não ocorreu alteração na frequência cardíaca, caracterizado pelo intervalo RR (figura 12, a). Referente ao intervalo PR, encontramos diferença significativa somente no grupo WT DMI quando comparado com seu respectivo controle, indicando que fêmeas DMI possuem um aumento da condução átrio-ventricular (figura 12, b). Na onda P, parâmetro que analisa a despolarização atrial não encontramos nenhuma alteração (figura 12, c), e respectivamente na despolarização ventricular, caracterizada pelo complexo QRS também não foram encontradas alterações significativas (figura 12, d). Entretanto, ao observamos o parâmetro QJ do eletrocardiograma observamos que nas fêmeas WT DMI esse intervalo encontra-se

aumentado em relação ao seu próprio controle. Surpreendentemente as fêmeas TLR4^{-/-} DMI apresentaram uma prevenção do aumento do intervalo QJ, sugerindo que o receptor TLR4 poderia estar envolvido na cardioproteção de camundongos fêmeas no modelo de DMI (figura 12, e).



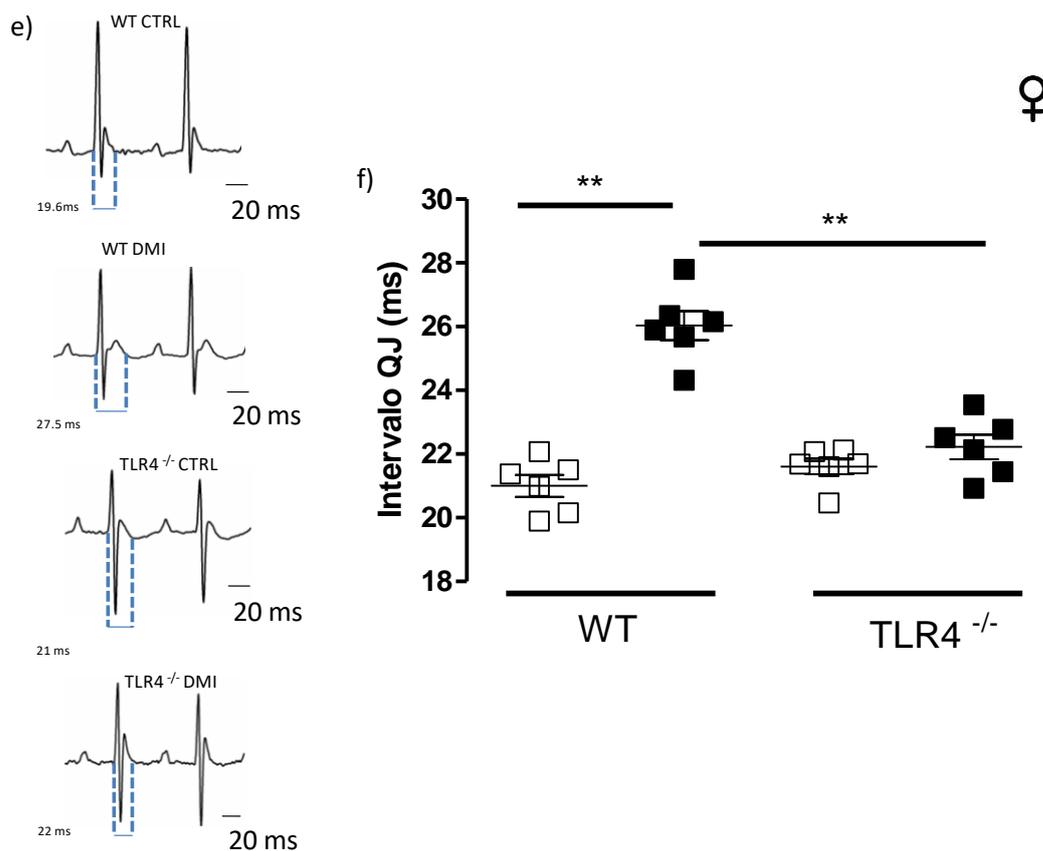


Figura 12 - Fêmeas TLR4^{-/-} previnem o aumento do intervalo QJ no modelo de DMI

Parâmetros analisados do ECG na derivação D1 em camundongos fêmeas. Frequência cardíaca, intervalo RR (Figura 13, a); condução átrio-ventricular, intervalo PR (figura 13, b); despolarização atrial, onda P (figura 13, c); despolarização ventricular, complexo QRS (figura 13, d). Traçado representativo dos 4 grupos experimentais, A linha azul indica o intervalo QJ (a (figura 13, e), e intervalo QJ em camundongos fêmeas (figura 13, f). Valores expressos como média \pm erro padrão da média; *p < 0,05 vs respectivos controles.

Analisando os parâmetros eletrocardiográficos podemos observar que a falta de receptor Tlr4 não foi capaz de prevenir as alterações ocasionadas pelo DMI em camundongos machos. Entretanto, as fêmeas apresentaram uma prevenção do intervalo QJ, importante preditor de morte subta em pacientes diabéticos. Com esses resultados nos perguntamos se a vulnerabilidade a arritmia também ocorreria de maneira sexo-específica. Para responder essa pergunta utilizamos um protocolo de cafeína (120 mg/kg) e dobutamina (50 μ g/kg) *in vivo*. Pode-se observar que as fêmeas WT DMI apresentaram maiores eventos arrítmicos em comparação com seu respectivo

controle. No entanto, as fêmeas TLR4 ^{-/-} DM apresentaram eventos de severidades semelhantes ao seu respectivo controle e as fêmeas WT CTRL (Figura 13, a).

Os camundongos machos DMI apresentaram maior severidade nos eventos arritmogênicos em relação aos seus controles. Esse mesmo padrão se manteve quando utilizamos machos TLR4 ^{-/-} e induzimos a DMI. Não observando diferenças entre TLR4 ^{-/-} DMI e seu respectivo controle (Figura 13, b). Através desses resultados podemos concluir que a falta do receptor TLR4 foi capaz de prevenir a severidade dos eventos arrítmicos em ambos os sexos.

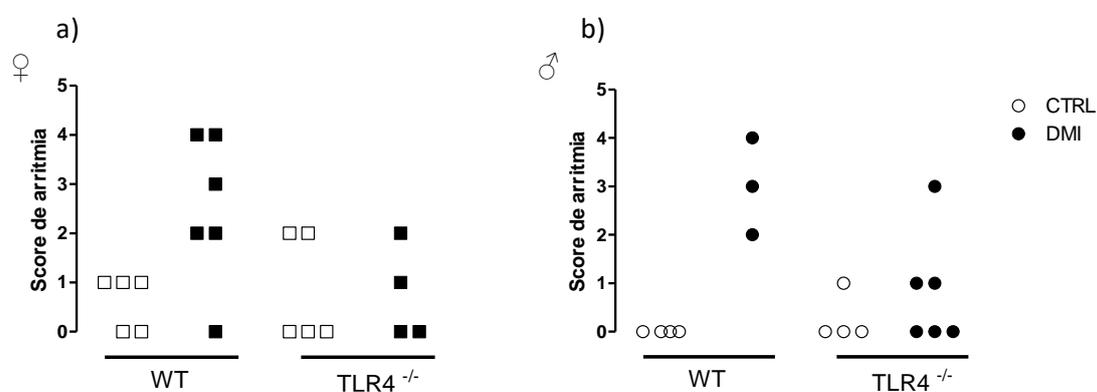


Figura 13 – A falta do receptor TLR4 preveniu a severidade de arritmias em ambos os gêneros.

Camundongos de ambos os sexos foram submetidos ao protocolo de arritmias. Os símbolos cheios são representativos aos animais controles e os símbolos vazios são representados pelos animais DMI.

Devido aos nossos dados terem mostrado que as fêmeas TLR4 ^{-/-} DMI previnem o aumento do intervalo QJ e conseqüentemente melhora a função elétrica desses corações, nos propomos a avaliar como estaria a expressão do RNAm no tecido cardíaco. Nossos resultados demonstraram que em camundongos machos diabéticos ocorre um aumento da expressão gênica de TLR4 quando comparado com seu respectivo controle. Todavia, observa-se que as fêmeas TLR4 ^{-/-} DMI conseguem prevenir o aumento da expressão gênica de TLR4 quando comparada com seu respectivo controle e em relação aos camundongos machos. Sugestionando que no modelo de DMI os machos expressam mais TLR4 no tecido cardíaco em relação as fêmeas (figura 14).

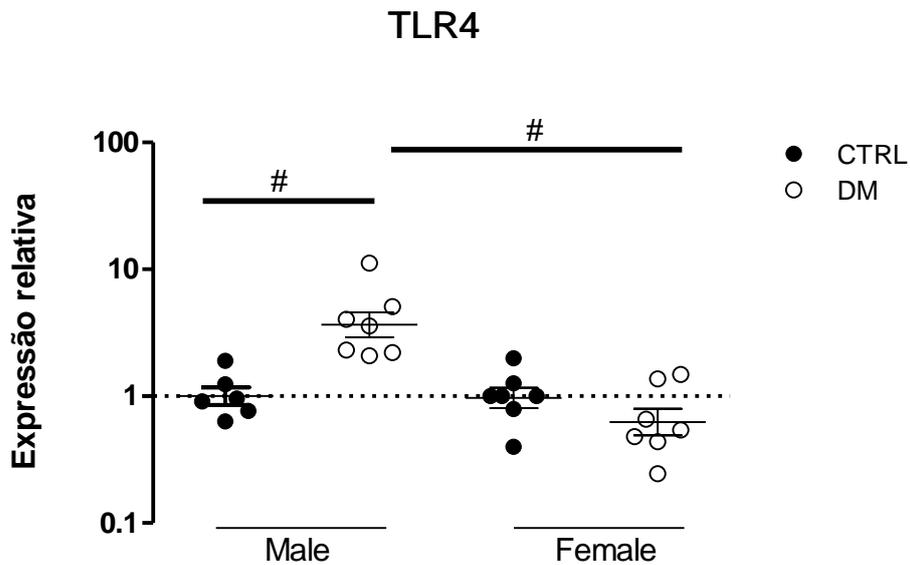


Figura 14 - Machos apresentam maior expressão de receptores TLR4 em comparação com fêmeas.

Expressão relativa do RNAm para o gene TLR4 comparativa entre machos e fêmeas. Os símbolos pretos são os controles e os símbolos brancos são os animais diabéticos. Valores expressos como média \pm erro padrão da média; # $p < 0,0001$ WT versus WTDM macho e WTDM macho versus TLR4^{-/-} DM fêmea.

A fim de compreender como é mediada essa cardioproteção observada em fêmeas TLR4^{-/-}, optamos por analisar se os receptores para estrogênio estariam alterados no DMI. Uma vez que, o estrogênio é um dos principais hormônios femininos e sabe-se que o mesmo possui uma ação cardioprotetora no sistema cardiovascular. Deste modo, os receptores para estrogênio ER- α e GPER foram quantificados no tecido cardíaco. Os resultados indicaram uma diminuição na expressão de RNAm nos grupos WT DMI, TLR4^{-/-} e TLR4^{-/-}DM quando comparados ao WT (Figura 15,a-b).

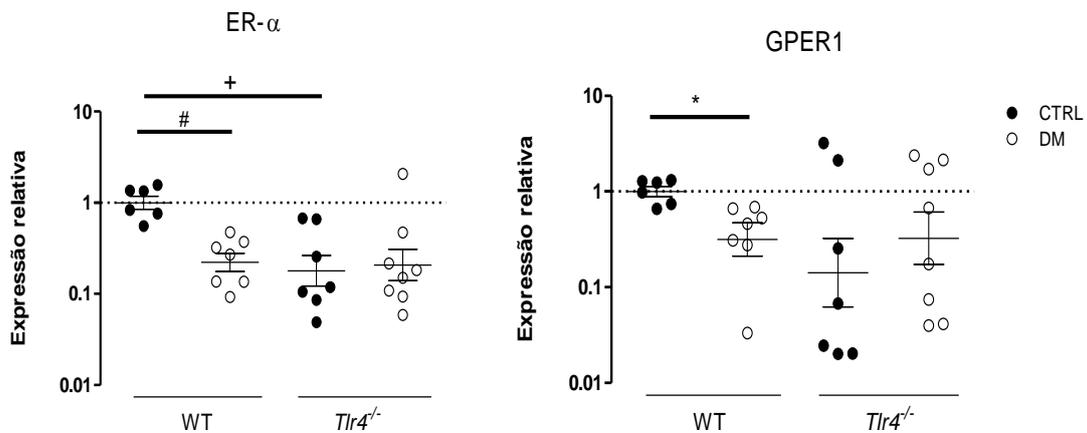


Figura 15 - Fêmeas TLR4^{-/-} apresentam uma redução da expressão dos receptores de estrogênio em corações.

Expressão gênica dos receptores de estrogênio alfa, ER- α (A) e receptores de estrogênio acoplados a proteína G, GPER1 (B) em corações de fêmeas. Valores expressos como média \pm erro padrão da média; * $p < 0.05$ WT versus seu próprio controle; # $p < 0.0001$ WT versus seu próprio controle; + $p < 0.001$ WT versus TLR4^{-/-}.

Tendo em vista nossos resultados anteriores, nos perguntamos se o estrogênio poderia interagir com o receptor TLR4 e conseqüentemente estar envolvido na preservação da função elétrica cardíaca de fêmeas TLR4^{-/-} no modelo de DMI. Para que possa ser avaliada a função do estrogênio sobre o TLR4, foram criados grupos de animais ovariectomizados. Deste modo, estaríamos tirando a influencia não só do estrogênio como também de todos os hormônios produzidos pelo ovário. Com isso, fomos avaliar primeiramente se a ovariectomia levaria a alguma alteração metabólica ou biométrica. Dados demonstraram que houve aumento na glicemia dos grupos WT^{OVX} DMI e TLR4^{-/-} ovx DMI (figura 16, a). O peso corporal não foi alterado exceto quando comparamos TLR4^{-/-} ovx versus TLR4^{-/-} ovx DMI (Figura 16, b). Observa-se uma diminuição significativa do peso uterino em todos os camundongos submetidos a OVX (Figura 16, c). Esses resultados indicam que nosso modelo de estudo foi validado.

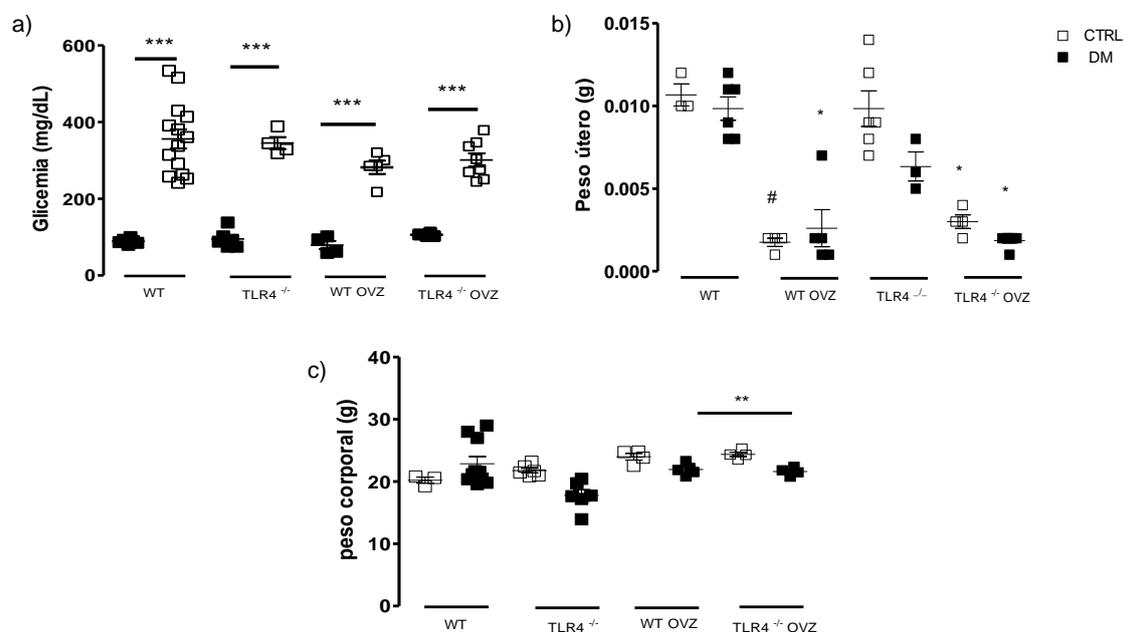


Figura 16 - Parâmetros biométricos e metabólicos em animais ovariectomizados

Análise da glicemia (a); peso corporal (b); peso do útero (c). Valores expressos como média \pm erro padrão da média; * $p < 0.05$, tratado versus controle experimental; # $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ tratado versus seu controle experimental.

Através da validação do nosso modelo de estudo, nos propomos a avaliar se o estrogênio estaria interagindo com o TLR4 e prevenindo as alterações elétricas cardíacas. Deste modo, gravamos um ECG *in vivo* e observamos que a ovariectomia não alterou o intervalo RR entre os todos os grupos (Figura 17, a). Porém, os animais do grupo TLR4^{-/-} OVX DMI apresentaram diminuição do intervalo PR comparado aos do grupo WT^{OVX} DMI, indicando redução na duração do tempo de condução do nodo átrio-ventricular (Figura 17, b). Não foram observadas diferenças significativas na onda P e no complexo QRS entre todos os grupos (figura 17, c-d). Observa-se que a repolarização ventricular dos animais WT e WT^{OVX} induzidos a DMI aumentaram o intervalo QJ. Entretanto, a ausência do receptor TLR4 foi capaz de prevenir o aumento

do intervalo QJ em animais TLR4^{-/-} OVX DMI. Esse resultado nos permite inferir que o estrogênio não estaria envolvido na cardioproteção observada em fêmeas TLR4^{-/-} (figura 13, e).

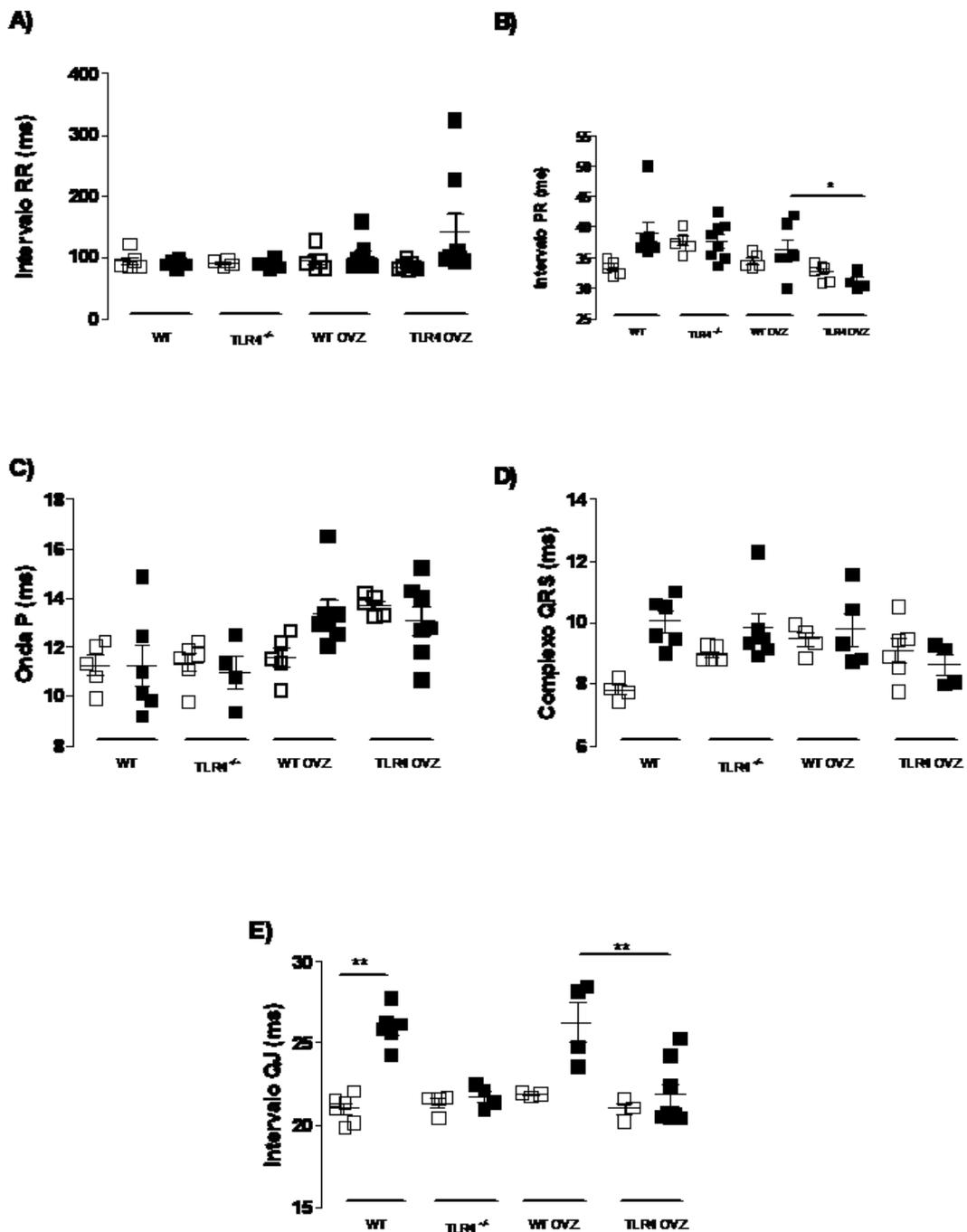


Figura 17 - Parâmetros elétricos dos camundongos ovariectomizados

Parâmetros analisados do ECG na derivação D1 em camundongos fêmeas. Frequência cardíaca, intervalo RR (a); condução átrio-ventricular, intervalo PR (b); despolarização atrial, onda P (c); despolarização ventricular, complexo QRS (d); repolarização ventricular, intervalo QT (e). Valores expressos como média \pm erro padrão da média; * $p < 0.05$, tratado versus seu respectivo controle e WT^{OVX} DM versus TLR4^{-/-} OVX DM; ** $p < 0,001$, tratado versus seu respectivo controle e WT^{OVX} DM versus TLR4^{-/-} OVX DM; *** $p < 0.001$, tratado versus seu respectivo controle.

11. Discussão

A diabetes *mellitus* do tipo I é uma doença poligênica de fisiopatologia ainda debatida. Estabelecida por um aumento dos níveis de glicose no sangue (Schmidt, Valeri e Leslie, 2005). Essa hiperglicemia crônica estabelece uma desregulação do sistema imunológico, levando a um aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, em especial a IL-1 β (Dasu *et al.*, 2008).

Durante o desenvolvimento do modelo experimental abordado nesse trabalho, foram usadas 5 doses de 50 mg/kg de STZ. Sabe-se que essa droga possui ação direta sobre as células beta-pancreáticas e também restringem a expressão de GLUT2. A diminuição desse transportador de glicose pode ser observada tanto em modelos *in vivo* quanto em modelos *in vitro*, quando utilizados em múltiplas doses. Esses mecanismos, podem ser observados através do aumento da glicemia nos animais submetidos ao tratamento com STZ após oito semanas, conforme demonstrado nesse trabalho (Szkudelski, 2001).

Na progressão do DM um dos agravantes observados é a cardiomiopatia diabética. Durante o desenvolvimento da CD observam-se fibroses, hipertrofia e disfunção contrátil, fatores que levam a um aumento da massa cardíaca. Esses fatores resultam no comprometimento da função mecânica, favorecendo um maior risco de mortalidade (Avila *et al.*, 2014). Nossos dados demonstram que os índices hipertróficos cardíacos não foram alterados em ambos os sexos. Contudo, um estudo de (Li *et al.*, 2011). demonstrou, que após a indução de DM, os parâmetros como: peso do coração e peso corporal, não sofreu alterações, corroborando com os nossos resultados.

Nosso grupo demonstrou que a liberação de citocinas pró-inflamatórias favorece o aumento dos intervalos QT e QTc, assim como vulnerabilidade a arritmias cardíacas (Monnerat *et al.*, 2016). De acordo com Monnerat-Cahli *et al.*, 2014, a ativação do receptor TLR4 aumentar a duração de repolarização ventricular em células cardíacas, fator que pré-dispõe ao surgimento de arritmias. Curiosamente, Alárcon. M. M, 2017 (Alarcón, 2017) através de experimentos *in vivo* demonstrou que o aumento

do intervalo QT e QTc em animais TLR4^{-/-} DMI, ocorre de maneira gênero-dependente. Resultado esse que podemos observar também em nossos animais.

Tendo os resultados de ECG demonstrado uma diferença sexo-específico no intervalo QJ em animais TLR4^{-/-} DMI,

Através do qPCR fomos analisar a expressão do RNAm para os receptores TLR4 no coração. Nossos resultados demonstraram que durante a DM há um aumento dos níveis desses receptores em machos em relação às fêmeas. Em parte, pode-se atribuir esse resultado com uma maior liberação de TNF α através de um estímulo de LPS (agonista TLR4) em monócitos derivados de machos (Aulock *et al.*, 2006).

Sabe-se que os hormônios sexuais estão interligados com a cardioproteção cardíaca. Onde já é bem descrito o papel do estro estrogênio na prevenção desses acometimentos (Mosca, Barrett-Connor e Kass Wenger, 2011). Por outra via, sabe-se que o estrogênio possui uma capacidade modulatória sobre mediadores pró-inflamatórios, liberados por macrófagos *in vivo* através da sinalização do ER α . Entretanto, nossos dados demonstram que no DM ocorre uma diminuição dos níveis da expressão gênica desses receptores tanto em animais selvagens quanto em animais *knockouts*. Outro receptor de estrogênio descrito com capacidade imuno-regulatória é o GPER30. Com a ativação deste receptor através de seu agonista G1 observou-se a capacidade de reduzir a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias como: IL-1 β , IL-18 e TNF α no miocárdio (Calippe *et al.*, 2010). Entretanto, através da DM ocorre uma diminuição da sua expressão. Portanto, esses resultados inferem que a DM, assim como falta de TLR4 poderia estar envolvida com uma menor expressão dos receptores de estrogênio no coração.

Para avaliar ação do estrogênio sobre a atividade elétrica cardíaca, animais OVX foram utilizados nesse estudo. Através de injeções intraperitoneais de STZ, observou-se que a falta do estrogênio não alterou os níveis altos de glicose. Com a ovariectomia bilateral observou-se uma redução do peso uterino. Essa redução pode ser

estabelecida por uma diminuição da espessura do epitélio e do número de glândulas uterinas. (Aulock *et al.*, 2006).

Nos parâmetros eletrocardiográficos observou-se que fêmeas OVX apresentaram o mesmo aumento do intervalo QJ, exceto pelo grupo TLR4^{-/-}ovx. Nesse grupo houve a prevenção do intervalo QJ, assim como observado posteriormente em fêmeas TLR4^{-/-}.(Alarcón 2017) Curiosamente, as fêmeas TLR4^{-/-}ovx DM também apresentaram essa prevenção. Desse modo, parece que o E₂ não estaria mediando essas alterações elétricas cardíacas através de uma possível interação com o receptor TLR4.

Contudo, a fim de compreender as particularidades entre gêneros, a interação entre os sistemas endócrino e imune, e o remodelamento elétrico cardíaco induzido pelo DMI, são necessários maiores estudos.

12. Conclusão

- A falta do receptor TLR4 preveniu o aumento do intervalo QJ em fêmeas, entretanto no outros parâmetros do ECG analisados não obtemos diferenças significativas entre machos e fêmeas.
- A DMTI aumenta a expressão dos receptores TLR4 cardíacos em machos, entretanto esse aumento é preservado nas fêmeas.
- A DMTI diminui a expressão dos receptores para estrogênio, assim como a falta de TLR4 não alterou a expressão gênica dos receptores de estrogênio no coração.
- O *crosstalk* entre estrogênio e TLR4 não foi observado no remodelamento elétrico cardíaco induzidos pelo DMI, entretanto são necessários maiores estudos para confirmar esse dado.

13. Referências Bibliográficas

- Adeghate, E. *et al.* (2010) "Medicinal Chemistry of Drugs Used in Diabetic Cardiomyopathy", *Current Medicinal Chemistry*, 17(6), p. 517–551. doi: 10.2174/092986710790416281.
- Alarcón, M. L. ope. (2017) *Maria Micaela López Alarcón Impacto da ativação do sistema imune inato na função elétrica e mecânica cardíaca.*
- Anand, S. S. *et al.* (2008) "Risk factors for myocardial infarction in women and men: Insights from the INTERHEART study", *European Heart Journal*, 29(7), p. 932–940. doi: 10.1093/eurheartj/ehn018.
- Aulock, S. Von *et al.* (2006) "Gender Difference in Cytokine Secretion on Immune Stimulation with LPS and LTA", *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 26(12), p. 887–892. doi: 10.1089/jir.2006.26.887.
- Avila, G. *et al.* (2014) "Functional and structural impact of pirfenidone on the alterations of cardiac disease and diabetes mellitus", *Cell Calcium*, 56(5), p. 428–435. doi: 10.1016/j.ceca.2014.07.008.
- Beagley, K. W. e Gockel, C. M. (2003) "Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone", *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 38(1), p. 13–22. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00202-5.
- Bellavere, F. *et al.* (1988) "Prolonged QT period in diabetic autonomic neuropathy: A possible role in sudden cardiac death?", *Heart*, 59(3), p. 379–383. doi: 10.1136/hrt.59.3.379.
- Bertoluci, M. C. (2015) "Endothelial dysfunction as a predictor of cardiovascular disease in type 1 diabetes", *World Journal of Diabetes*, 6(5), p. 679. doi: 10.4239/wjd.v6.i5.679.
- Bluestone, J. A. *et al.* (2016) "diabetes", 464(7293), p. 1293–1300.
- Cai, W. *et al.* (2011) "Epigenetic Regulation of Glucose Transporter 4 by Estrogen Receptor β ", *Molecular Endocrinology*, 25(12), p. 2017–2028. doi: 10.1210/me.2011-1054.
- Calippe, B. *et al.* (2010) "17 -Estradiol Promotes TLR4-Triggered Proinflammatory Mediator Production through Direct Estrogen Receptor Signaling in Macrophages In Vivo", *The Journal of Immunology*, 185(2), p. 1169–1176. doi: 10.4049/jimmunol.0902383.
- Chuang, S. M. *et al.* (2013) "Protective effects of estrogen on ischemia/reperfusion-induced bladder dysfunction in female rabbits", *Menopause*, 20(2), p. 209–217. doi: 10.1097/gme.0b013e3182635bae.
- Crisel, R. K. *et al.* (2011) "First-degree atrioventricular block is associated with heart failure and death in persons with stable coronary artery disease: Data from the Heart and Soul Study", *European Heart Journal*, 32(15), p. 1875–1880. doi: 10.1093/eurheartj/ehr139.
- Dasu, M. R. M. R. *et al.* (2008) "High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes",

Diabetes, 57(11), p. 3090. doi: 10.2337/db08-0564.

Dietl, A. e Maack, C. (2017) "Targeting Mitochondrial Calcium Handling and Reactive Oxygen Species in Heart Failure", *Current Heart Failure Reports*. *Current Heart Failure Reports*, 14(4), p. 338–349. doi: 10.1007/s11897-017-0347-7.

Dogan, Y. *et al.* (2006) "Serum IL-1 β , IL-2, and IL-6 in insulin-dependent diabetic children", *Mediators of Inflammation*, 2006. doi: 10.1155/MI/2006/59206.

Dow, J. S. *et al.* (2015) "Does sex influence the incidence or severity of reperfusion-induced cardiac arrhythmias?", *SpringerPlus*, 4(1). doi: 10.1186/s40064-015-0878-x.

Félétou, M. e Vanhoutte, P. M. (2006) "Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture)", *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 291(3), p. H985–H1002. doi: 10.1152/ajpheart.00292.2006.

Fernández-Velasco, M. *et al.* (2007) "TNF- α downregulates transient outward potassium current in rat ventricular myocytes through iNOS overexpression and oxidant species generation", *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 293(1), p. H238–H245. doi: 10.1152/ajpheart.01122.2006.

Fuentes, L. *et al.* (2016) "HHS Public Access", 93(4), p. 292–297. doi: 10.1016/j.contraception.2015.12.017.Women.

Geerlings, S. E. e Hoepelman, a I. (1999) "Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM).", *FEMS immunology and medical microbiology*, 26(3–4), p. 259–265. doi: 10.1111/j.1574-695X.1999.tb01397.x.

Girón-González, J. A. *et al.* (2000) "Consistent production of a higher T(H)1:T(H)2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women", *European Journal of Endocrinology*, 143(1), p. 31–36. doi: 10.1530/eje.0.1430031.

Gupta, S. *et al.* (2017) "Analysis of inflammatory cytokine and TLR expression levels in Type 2 Diabetes with complications", *Scientific Reports*, 7(1), p. 1–10. doi: 10.1038/s41598-017-07230-8.

Gussak, I. *et al.* (2000) "Rapid Ventricular Repolarization in Rodents: Electrocardiographic Manifestations, Molecular Mechanisms, and Clinical Insights", *Journal of Electrocardiology*, 33(2), p. 159–170. doi: 10.1016/s0022-0736(00)80072-2.

Haynes, M. P. *et al.* (2003) "Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen", *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), p. 2118–2123. doi: 10.1074/jbc.M210828200.

Israili, Z. H. (2011) "Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus", *American Journal of Therapeutics*, 18(2), p. 117–152. doi: 10.1097/MJT.0b013e3181afb51.

- Jin, K. K. *et al.* (2006) "Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms", *Journal of Biological Chemistry*, 281(10), p. 6760–6767. doi: 10.1074/jbc.M511024200.
- Kahn, J. K., Sisson, J. C. e Vinik, A. I. (1987) "QT interval prolongation and sudden cardiac death in diabetic autonomic neuropathy", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 64(4), p. 751–754. doi: 10.1210/jcem-64-4-751.
- Katsarou, A. *et al.* (2017) "Type 1 diabetes mellitus", *Nature Reviews Disease Primers*. Macmillan Publishers Limited, 3, p. 1–18. doi: 10.1038/nrdp.2017.16.
- Kawada, H. *et al.* (2006) "Tumor necrosis factor-alpha downregulates the voltage gated outward K+ current in cultured neonatal rat cardiomyocytes: a possible cause of electrical remodeling in diseased hearts.", *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 70(5), p. 605–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16636498>.
- Klein, S. L. e Flanagan, K. L. (2016) "Sex differences in immune responses", *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 16(10), p. 626–638. doi: 10.1038/nri.2016.90.
- Lee, S. J. *et al.* (2001) "Effect of estrogen on endothelial dysfunction in postmenopausal women with diabetes", *Diabetes Research and Clinical Practice*, 54, p. S81–S92. doi: 10.1016/S0168-8227(01)00339-4.
- Leon, B. M. (2015) "Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research", *World Journal of Diabetes*, 6(13), p. 1246. doi: 10.4239/wjd.v6.i13.1246.
- Li, Y. *et al.* (2011) "Targeted inhibition of calpain reduces myocardial hypertrophy and fibrosis in mouse models of type 1 diabetes", *Diabetes*, 60(11), p. 2985–2994. doi: 10.2337/db10-1333.
- Libby, P., Ridker, P. M. e Hansson, G. K. (2009) "Inflammation in Atherosclerosis From Pathophysiology to Practice", *Journal of the American College of Cardiology*, 54(23), p. 2129–2138. doi: 10.1016/j.jacc.2009.09.009.Inflammation.
- Liu, X. J. *et al.* (2016) "TLR signaling adaptor protein MyD88 in primary sensory neurons contributes to persistent inflammatory and neuropathic pain and neuroinflammation", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(March), p. 1–11. doi: 10.1038/srep28188.
- Malta, D. C. *et al.* (2014) "Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões, 2000 a 2011", *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 23(4), p. 599–608. doi: 10.5123/S1679-49742014000400002.
- Melchjorsen, J. *et al.* (2005) "Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I

and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner”, *Journal of virology*, 79(20), p. 12944. doi: 10.1128/JVI.79.20.12944.

Monnerat-Cahli, G. *et al.* (2014) “Toll-like receptor 4 activation promotes cardiac arrhythmias by decreasing the transient outward potassium current (I_{to}) through an IRF3-dependent and MyD88-independent pathway”, *Journal of molecular and cellular cardiology*. Elsevier Ltd, 76, p. 116–125. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.08.012.

Monnerat, G. *et al.* (2016) “Macrophage-dependent IL-1 β production induces cardiac arrhythmias in diabetic mice”, *Nature Communications*, 7. doi: 10.1038/ncomms13344.

Mosca, L., Barrett-Connor, E. e Kass Wenger, N. (2011) “Sex/gender differences in cardiovascular disease prevention: What a difference a decade makes”, *Circulation*, 124(19), p. 2145–2154. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.968792.

Nativel, B. *et al.* (2013) “Soluble HMGB1 Is a Novel Adipokine Stimulating IL-6 Secretion through RAGE Receptor in SW872 Preadipocyte Cell Line: Contribution to Chronic Inflammation in Fat Tissue”, *PLoS ONE*, 8(9), p. 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0076039.

Niemeijer, M. N. *et al.* (2015) “Pharmacogenetics of Drug-Induced QT Interval Prolongation: An Update”, *Drug Safety*. Springer International Publishing, 38(10), p. 855–867. doi: 10.1007/s40264-015-0316-6.

Odening, K. E. *et al.* (2012) “Estradiol promotes sudden cardiac death in transgenic long QT type 2 rabbits while progesterone is protective”, *Heart Rhythm*. Elsevier Inc., 9(5), p. 823–832. doi: 10.1016/j.hrthm.2012.01.009.

Panama, B. K. *et al.* (2011) “Nuclear factor kb downregulates the transient outward potassium current I_{to,f} through control of KChIP2 expression”, *Circulation Research*, 108(5), p. 537–543. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.229112.

Patterson, C. C. *et al.* (2003) “Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes”, *Diabetologia*, 46(6), p. 760–765. doi: 10.1007/s00125-003-1116-6.

Peters, S. A. E. *et al.* (2015) “Sex Differences in the Excess Risk of Cardiovascular Diseases Associated with Type 2 Diabetes: Potential Explanations and Clinical Implications”, *Current Cardiovascular Risk Reports*, 9(7), p. 1–7. doi: 10.1007/s12170-015-0462-5.

Rana, B. S. *et al.* (2005) “QT interval abnormalities are often present at diagnosis in diabetes and are better predictors of cardiac death than ankle brachial pressure index and autonomic function tests”, *Heart*, 91(1), p. 44–50. doi: 10.1136/hrt.2003.017632.

Regensteiner, J. G. *et al.* (2015) “Sex differences in the cardiovascular consequences of diabetes mellitus a scientific statement from the American Heart Association”, *Circulation*, 132(25), p. 2424–2447. doi:

10.1161/CIR.0000000000000343.

Roberts, B. J. *et al.* (2012) "Sex-specific signaling through Toll-Like Receptors 2 and 4 contributes to survival outcome of Coxsackievirus B3 infection in C57Bl/6 mice", *Biology of Sex Differences*. *Biology of Sex Differences*, 3(1), p. 1. doi: 10.1186/2042-6410-3-25.

Schmidt, K. D., Valeri, C. e Leslie, R. D. G. (2005) "Autoantibodies in Type 1 diabetes", *Clinica Chimica Acta*, 354(1–2), p. 35–40. doi: 10.1016/j.cccn.2004.11.017.

Sena, C. M., Pereira, A. M. e Seica, R. (2013) "Endothelial dysfunction - A major mediator of diabetic vascular disease", *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V., 1832(12), p. 2216–2231. doi: 10.1016/j.bbdis.2013.08.006.

Smith, J. W. *et al.* (2017) "PR-Interval Components and Atrial Fibrillation Risk (from the Atherosclerosis Risk in Communities Study)", *American Journal of Cardiology*, 119(3), p. 466–472. doi: 10.1016/j.amjcard.2016.10.016.

Suys, B. (2006) "Glycemia and Corrected QT Interval Prolongation in Young Type 1 Diabetic", *Diabetes Care*, 29(2), p. 2–4.

Szkudelski, T. (2001) "The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas", *Physiological Research*, 50(6), p. 537–546. doi: 10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x.

Troutman, T. D., Bazan, J. F. e Pasare, C. (2012) "Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K", *Cell Cycle*, 11(19), p. 3559–3567. doi: 10.4161/cc.21572.

Versteeg, D. *et al.* (2009) "Toll-like receptor 2 and 4 response and expression on monocytes decrease rapidly in patients undergoing arterial surgery and are related to preoperative smoking", *Shock*, 31(1), p. 21–27. doi: 10.1097/SHK.0b013e31817d43bf.

Vitale, C., Mendelsohn, M. E. e Rosano, G. M. C. (2009) "Gender differences in the cardiovascular effect of sex hormones", *Nature Reviews Cardiology*. Nature Publishing Group, 6(8), p. 532–542. doi: 10.1038/nrcardio.2009.105.

Voulgari, C., Papadogiannis, D. e Tentolouris, N. (2010) "Diabetic cardiomyopathy: From the pathophysiology of the cardiac myocytes to current diagnosis and management strategies", *Vascular Health and Risk Management*, 6(1), p. 883–903. doi: 10.2147/VHRM.S11681.

WALLEY, K. *et al.* (2006) "Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF- κ B dependent inflammatory response☆", *Cardiovascular Research*, 72(3), p. 384–393. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.09.011.

Zha, Q. B. *et al.* (2016) "ATP-induced inflammasome activation and pyroptosis is regulated by AMP-

activated protein kinase in macrophages”, *Frontiers in Immunology*, 7(DEC), p. 1–16. doi: 10.3389/fimmu.2016.00597.