



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

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

**Ainhoa Rodriguez de Yurre Guirao**

**Tese de qualificação de Doutorado**

**Orientador: Prof. Dr. Emiliano Medei**

**Co orientador: Prof. Dr. Oscar Casis Sáenz**

**Rio de Janeiro**

**Setembro de 2018**

**Ainhoa Rodriguez de Yurre**

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

**Dissertação de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 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 Cardiologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Emiliano Medei**

**Co Orientador: Prof. Dr. Oscar Casis Sáenz**

**Rio de Janeiro**

**Setembro de 2018**

***Ziren haietatik izatera gatoz***

## SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	1
LISTA DE ESQUEMAS	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	6
1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Justificativa	7
1.2. Diabetes mellitus tipo 2	9
1.3. Resistência à insulina	10
1.4. Complicações a longo prazo do diabetes	11
1.5. Modelos animais de DT2	13
2. HIPÓTESE DO TRABALHO	14
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivo geral	15
3.2. Objetivos específicos	15
4. METODOLOGIA	16
4.1. Local da pesquisa	16
4.2. Comitê de ética	16
4.3. Animais	16
4.4. Desenho experimental	16
4.5. Medida da hipertrofia cardíaca	18
4.6. Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (IPGTT) e teste intraperitoneal de tolerância à insulina (IPITT)	18

4.7. Registros de eletrocardiograma (ECG)	18
4.8. Protocolo de arritmias	19
4.9. Registro de potencial de ação em coração intacto	20
4.10. Isolamento de cardiomiocitos	21
4.11. Registro de correntes iônicas	22
4.11.1. Registro da corrente transitória de saída de potássio ( $I_{to}$ )	24
4.12. Ressonância magnética	24
4.13. Dosagem dos níveis de insulina	25
4.14. Detecção de citocinas	25
4.15. Isolamento mitocondrial	25
4.16. Respirometria de alta resolução e medida da produção de $H_2O_2$ por fluorescência	26
4.17. Atividade da Citrato sintase	27
4.18. Análise estatístico	27
5. RESULTADOS	28
1- Estabelecer um modelo animal experimental de dt2 utilizando HFD (45%) e baixa dose de estreptozotocina (STZ)	28
2- Estudar as alterações elétricas (ECG, PA) no modelo experimental de DT2	30
3- Identificar os mecanismos iônicos subjacentes as alterações elétricas observadas	31
4- Estudar as alterações mecânicas subjacentes as alterações elétricas observadas	33
5- Investigar o consumo de oxigênio suportado pelos diferentes substratos do sistema de transporte de elétrons (STE), mensurar a produção de $H_2O_2$ e quantificar a atividade da citrato sintase	35
6- Estudar o papel do sistema imune inato no DT2	37
6. DISCUSSÃO	45

7. CONCLUSÕES	49
8. REFERÊNCIAS	50

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA	Associação Americana do Diabetes, do inglês <i>American Diabetes Association</i>
BPM	Batimentos por minuto
caf	Cafeína
CaMKII	Calmodulina dependente de quinase II
CASP-1	Caspase-1
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 Gestacional
DNTB	Ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoico
DM	Diabetes Mellitus
dob	Dobutamina
DT1	Diabetes Tipo 1
DT2	Diabetes Tipo 2
ECG	Eletrocardiograma
EF	Fração de ejeção, do inglês <i>Ejection Fraction</i>
ELISA	Ensaio por imunoadsorção ligado à enzimas, do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent assay</i>
EROs	Especies reativas de oxigênio
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
FOV	Campo de visão, do inglês <i>Field Of View</i>

HFD	Dieta hiperlipídica, do inglês <i>High Fat Diet</i>
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
IDF	Federação Internacional do Diabetes, do inglês <i>International Diabetes Federation</i>
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
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>
MiRO5	Tampão de respiração, do inglês <i>Mitochondrial Respiratory Solution 05</i>
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa B, do inglês <i>Nuclear Transcription Factor kappa B</i>
PA	Potencial de ação
pA	Picoamperios
pF	Picofaradios
PVC	Batimentos ventriculares prematuros, do inglês <i>Premature Ventricular Complex</i>
RIA	Radio Imuno Ensaio, do inglês <i>Radioimmunoassay</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
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
TNB	Ácido 2-nitro-5-benzoico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
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>

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	As 10 causas principais de morte no mundo no ano 2016	7
Esquema 2	Distribuição mundial da população afetada pelo DM, mapa obtido da IDF, 8ª edição 2017	8
Esquema 3	Sequência de aminoácidos de insulina humana	10
Esquema 4	Representação de um registro de potencial de ação cardíaco do ventrículo esquerdo sadio vs diabético	12
Esquema 5	Desenho experimental	17
Esquema 6	Registro de eletrocardiograma em camundongo C57bl/6 controle na derivação I	19
Esquema 7	Sistema de perfusão retrograda de Langendorff	21
Esquema 8	Diagrama da configuração <i>whole-cell</i> da técnica de Patch Clamp	23
Esquema 9	Representação da ativação do inflamossoma NLRP3	39

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Parâmetros biométricos e bioquímicos após 6 semanas do tratamento	28
Figura 2	Estudo da tolerância à glicose e insulina	30
Figura 3	Parâmetros elétricos (ECG e PA) após 6 semanas de tratamento	31
Figura 4	Parâmetros elétricos (Patch Clamp) após 6 semanas de tratamento	32
Figura 5	Papel do DT2 na vulnerabilidade a desenvolver arritmias cardíacas	32
Figura 6	Papel do DT2 nas alterações mecânicas	34
Figura 7	Consumo de O <sub>2</sub> pelos diferentes substratos do STE	35
Figura 8	Atividade da citrato sintase (CS)	36
Figura 9	Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nos diferentes substratos do STE	37
Figura 10	Parâmetros biométricos e bioquímicos dos animais KO para NLRP3, CASP1 e IL1R	40
Figura 11	Parâmetros elétricos dos animais KO para NLRP3, CASP1 e IL1R após 6 semanas de tratamento	42
Figura 12	A supressão da molécula NLRP3 não melhora a função mecânica nos animais DT2	43

## LISTA DE TABELAS

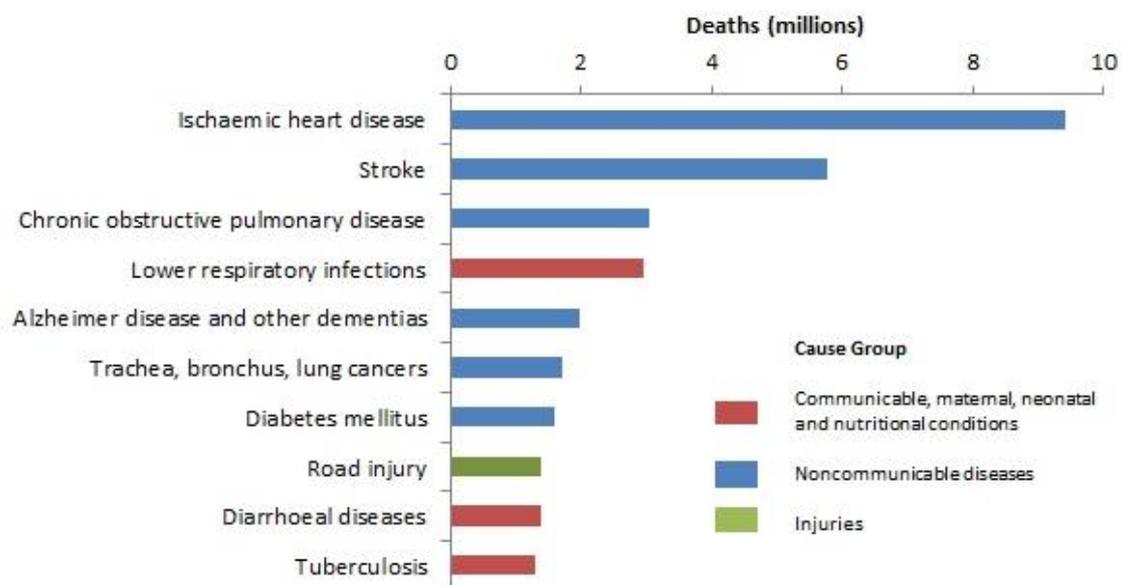
Tabela 1	Composição da dieta normal e dieta hipercalórica (HFD)	17
----------	--	----

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. JUSTIFICATIVA

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 (WHO), cada ano morrem mais pessoas por alguma doença cardiovascular que por qualquer outra causa. Estima-se que no ano 2012 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 cardiopatias coronárias e 6,7 milhões a acidentes vasculares cerebrais. As doenças cardiovasculares afetam em maior proporção aos países de renda baixa e média, sendo que mais do 80% dos óbitos por esta causa acontecem nesses países e afeta, praticamente por igual, tanto a homens quanto a mulheres. Dentre os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento destas doenças, encontram-se o sedentarismo, alimentação inadequada e o tabagismo, que favorecem o desenvolvimento de hipertensão arterial, hiperglicemia, hiperlipidemia e obesidade. Calcula-se que para 2030, quase 23,6 milhões de pessoas morrerão por alguma doença cardiovascular e estima-se estas doenças continuem sendo a principal causa de morte no mundo como mostrado no **esquema 1** (WHO World Health Organization, 2018).



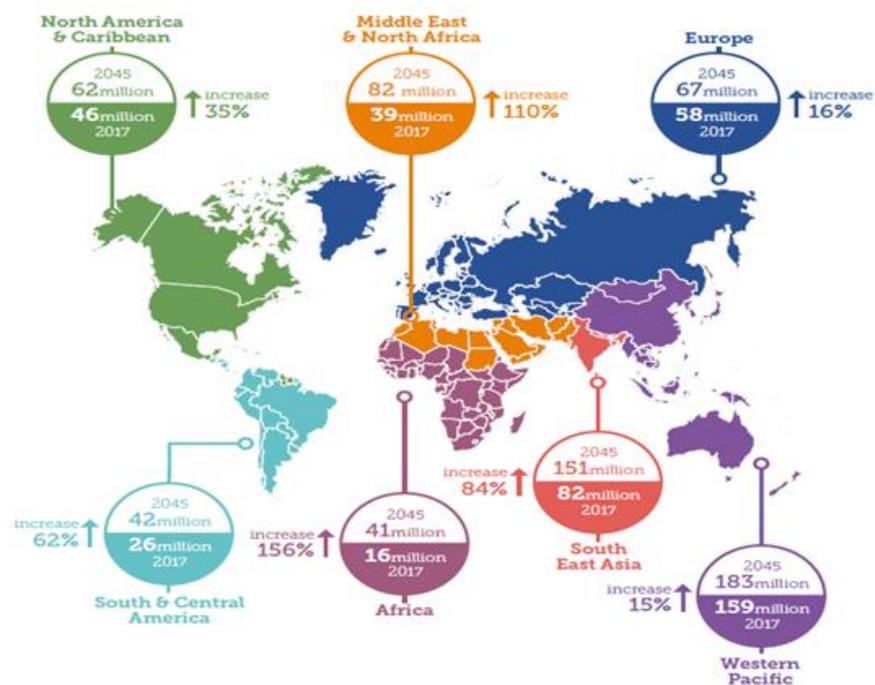
**Esquema 1:** As 10 causas principais de morte no mundo no ano 2016 (Fonte: World Health Organization, 2018).

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 8<sup>th</sup> edition, 2017). Os pacientes diabéticos

apresentam o dobro de incidência de desenvolver doenças cardíacas que os pacientes não diabéticos (KOVACIC et al., 2014; SZUSZKIEWICZ-GARCIA; DAVIDSON, 2014).

Atualmente, a Federação Internacional de Diabetes (IDF) 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 2045 (World Health Organization, 2016), sendo a maior prevalência nos países do pacífico ocidental, sudeste asiático, Europa e América do Norte e Caribe como mostrado no **esquema 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 um 61,8%, isto é, a doença passou de atingir 5,5% da população para 8,9% das pessoas. Isto é devido a fatores como o envelhecimento da população, mudanças dos hábitos alimentares e sedentarismos (DataSUS, 2017).



**Esquema 2:** Distribuição mundial da população afetada pelo DM, mapa obtido da IDF, 8ª edição 2017.

O diabetes é uma síndrome caracterizada por uma 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 em sangue podem produzir danos a longo prazo em vários órgãos principalmente rins, olhos, coração e sistema nervoso, que implicam complicações tais como doenças cardiovasculares, neuropatia, nefropatia ou doenças oculares que terminam em retinopatia e cegueira (ALAM et al., 2014).

Principalmente existem 3 tipos de diabetes, as quais aparecem quando o organismo não é capaz de produzir insulina suficiente ou quando essa insulina não pode ser utilizada de maneira eficiente: 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 autoimune das células beta pancreáticas produtoras de insulina, resultando numa deficiência absoluta de insulina pelo que a concentração de glicose em sangue destes pacientes é muito elevada. Este tipo de diabetes apresenta-se geralmente em idades precoces, geralmente em pessoas menores de 30 anos, pelo que também é chamada de diabetes juvenil, embora possa aparecer em qualquer idade (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011). O DT2 aparece geralmente em idades tardias e resulta de um defeito progressivo da secreção de insulina acompanhado de uma resistência à insulina (GRUNDY et al., 1999). Finalmente, existem mulheres que durante a gravidez desenvolvem uma resistência à insulina acompanhada de um acréscimo na concentração de glicose em sangue. Esse tipo de diabetes é denominado diabetes gestacional (DG) e aparece entre a 24ª e a 28ª semana de gravidez e é devido aos hormônios secretados pelo pâncreas, que bloqueiam a ação da insulina. Este tipo de diabetes pode desaparecer depois do parto (IDF Diabetes Atlas 1<sup>st</sup> edition, 2000).

Dentre os tipos de diabetes, o DT2 é o de maior incidência na população, sendo que cerca do 90% dos pacientes diabéticos no mundo apresentam DT2, podendo desenvolver doenças cardiovasculares aumentando o risco de morte nessa população (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001). Neste projeto de 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 de uma produção inadequada de insulina e da incapacidade do organismo de responder plenamente ao 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 biomédica. Assim, em 1960 Rosalyn Yalow e Solomon Berson utilizando a técnica do raioimunoensaio, 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).

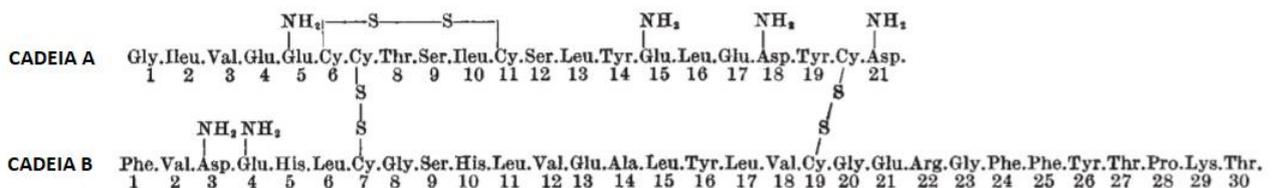
Outros pesquisadores mostraram que, embora as pessoas em etapas prematuras do DT2 produzem mais insulina do normal, com o passar do tempo, seus níveis de insulina decaem e eventualmente esses níveis ficam abaixo do que observado em indivíduos normais, e essa diabetes torna-se severa (AHMED, 2002). O 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, o qual permite a esses pacientes 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 de insulina (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).

### 1.3. RESISTÊNCIA À INSULINA

O DT2 é caracterizado por uma resistência à insulina, produção deficiente de insulina e falha nas células beta pancreáticas que leva a uma diminuição no transporte de glicose para o fígado, músculo, tecido adiposo e cérebro, resultando num aumento de glicose em 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. É uma pequena molécula composta por 51 aminoácidos (**esquema 3**), organizados em uma cadeia A de 21 peptídeos e outra cadeia B de 30 peptídeos unidas por dois pontes dissulfeto e com um peso molecular de 5808 Da (NICOL; SMITH, 1960).



**Esquema 3:** 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 se liga ao seu receptor, uma glicoproteína de membrana formada por duas subunidades alfa ( $\alpha$ ) e duas subunidades beta ( $\beta$ ). A subunidade  $\alpha$  de 135kDa contém o lugar de união para a insulina, é totalmente extracelular e se liga à região extracelular da subunidade  $\beta$  assim como com a outra subunidade  $\alpha$ , através de pontes dissulfeto. A subunidade  $\beta$ , de 95kDa, 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 ao desenvolvimento de outras condições como dislipidemia, hipertensão e aterosclerose (KAHN; FLIER, 2000).

#### **1.4. COMPLICAÇÕES A LONGO PRAZO DO DIABETES**

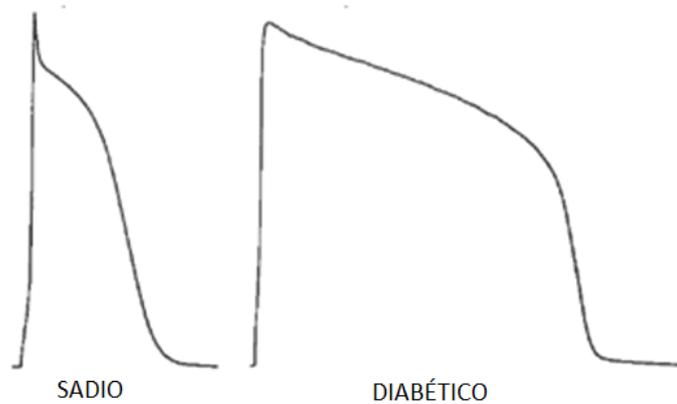
Nos últimos anos, avançou-se muito no tratamento do diabetes melhorando a expectativa de vida destes pacientes. Porém, ao aumentar a dita expectativa de vida, apareceram complicações a longo prazo como hipertensão, retinopatia diabética, neuropatia diabética, microangiopatia, insuficiência renal ou cardiopatia diabética, que produz tanto alterações mecânicas quanto elétricas, e é responsável por 65% dos óbitos que se produzem 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 arteriosclerose coronariana e hipertensão e afeta tanto a capacidade contrátil do miócito, quanto a inervação autônoma do coração (GALLEGO M. & CASIS O., 2014). Os mecanismos que acarretam o desenvolvimento da cardiopatia diabética ainda não são completamente conhecidos, porém parece ser devido ao dano celular produzido pela hiperglicemia. Os estágios iniciais da cardiopatia diabética se associam a 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, a principal alteração observada no ECG dos pacientes diabéticos (quando comparados com pacientes não diabéticos), são um prolongamento do intervalo QT corrigido (QTc) e um aumento da dispersão desse intervalo QT (QTd) (VEGLIO et al., 2002). Ambas alterações estão associadas a um maior risco de gerar arritmias cardíacas, o qual explica a maior incidência de postpotenciais, arritmias ventriculares e morte súbita que foi demonstrada em pacientes diabéticos. Essas alterações no ECG refletem o aumento da duração do potencial de ação (PA) e consequente redução das correntes iônicas envolvidas na depolarização cardíaca (ROBILLON et al., 1999). Essa elevada incidência torna indispensável conhecer os mecanismos responsáveis da geração destas arritmias.

Casis e colaboradores (CASIS et al., 2000), empregando um modelo animal de DM induzida, mostraram que existe uma variabilidade regional na duração do PA cardíaco e que em cardiomiócitos diabéticos o prolongamento do PA é maior no

endocárdio do ventrículo esquerdo e menor no ventrículo direito. O prolongamento, observado pelos autores na duração do PA (**esquema 4**), pode ser explicado por uma alteração na densidade da corrente repolarizante ( $I_{to}$ ) envolvida no PA.



**Esquema 4:** Representação de um registro de potencial de ação cardíaco do ventrículo esquerdo no qual se observa 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 o diabetes foi induzido com substâncias tóxicas às células beta pancreáticas, como o aloxano ou a estreptozotocina (STZ, do inglês *Streptozotocin*). Nesses estudos, tem sido mostrado que os modelos animais reproduzem o remodelamento elétrico cardíaco presente nos pacientes humanos (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 afeta a expressão de uma grande quantidade de proteínas incluindo os canais iônicos (O'BRIEN; GRANNER, 1996). A segunda hipótese postula que a alteração no comportamento das correntes de  $K^+$  deve-se ao metabolismo da glicose defeituosa (XU et al., 2002).

Tem sido mostrado 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 do deterioro do estado metabólico das células cardíacas. Enquanto que a alteração de suas propriedades biofísicas é devido a 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).

Embora cerca de 90% dos pacientes diabéticos apresentam DT2, todos os trabalhos experimentais em eletrofisiologia têm sido 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.

### **1.5. MODELOS ANIMAIS DE DT2**

Existem vários modelos animais de DT2, os quais podem ser classificados em função do seu mecanismo de produção como espontâneos e induzidos. Além disso, em cada uma dessas categorias podemos distinguir dois modelos: análogos e induzidos. 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 detectada 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 Oletf, o rato Zucker, o camundongo db/db ou o camundongo ob/ob (CHATZIGEORGIU et al., 2009).

Já nos modelos induzidos, existem vários modelos induzidos mediante 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 alguma das manifestações clínicas do DT2 (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 hiperlipídica junto com 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 e mecânico cardíaco classicamente descrito nesta síndrome.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

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

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Estabelecer um modelo animal experimental de DT2 utilizando HFD (45%) e baixa dose de Estreptozotocina (STZ);
- ✓ Estudar as alterações elétricas no modelo experimental do DT2 (ECG e PA);
- ✓ Identificar os mecanismos iônicos subjacentes a essas alterações elétricas (Patch Clamp);
- ✓ Estudar as alterações mecânicas subjacentes a essas alterações (RMN);
- ✓ Investigar o consumo de oxigênio suportado pelos diferentes substratos do sistema de transporte de elétrons (STE), mensurar a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e quantificar a atividade da citrato sintase;
- ✓ Estudar o papel do sistema imune inato no DT2.

## 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 Eletrofisiologia 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 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 Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (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* gerados a partir da cepa C57BL/6 mantidos no biotério do Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO) nas mesmas condições. A eutanásia foi induzida utilizando excesso de isoflurano e finalizada por deslocamento cervical.

### 4.4. DESENHO EXPERIMENTAL

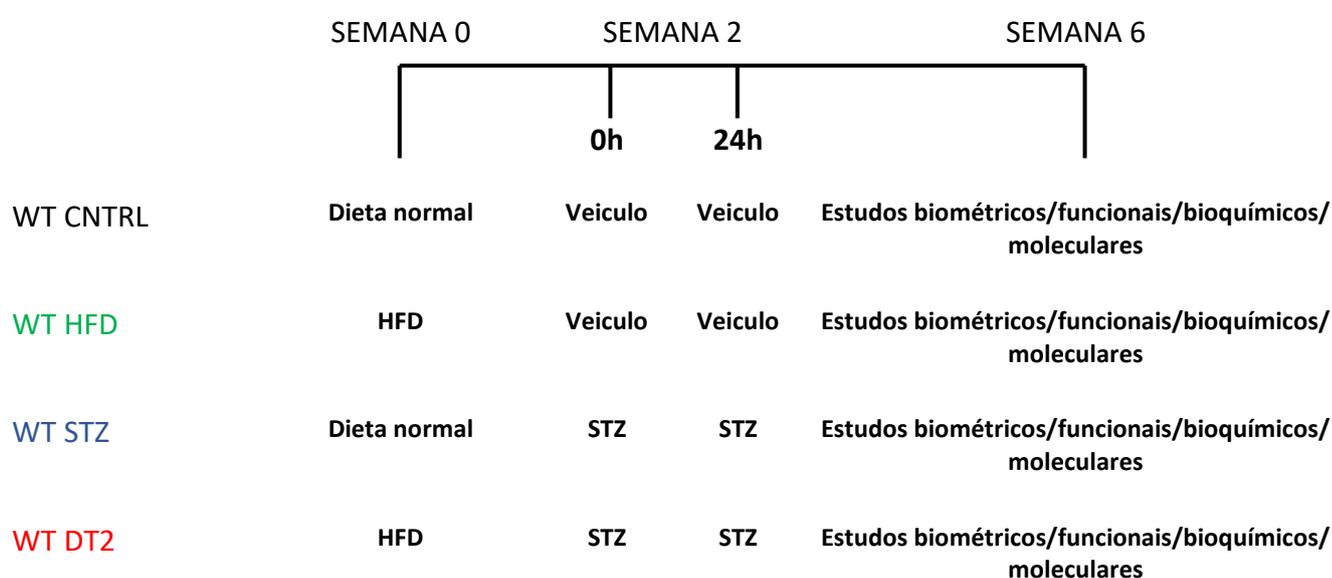
Os animais foram separados em 4 grupos experimentais como descrito no **esquema 5**: WT CNTRL (grupo controle), WT HFD, WT STZ e WT DT2. Tanto os animais do grupo HFD quanto os animais do grupo DT2, foram alimentados com uma ração hipercalórica ou high fat diet (HFD) (PRAGSOLUÇÕES Biociências) que contem 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 controle e os animais do grupo STZ foram alimentados com uma dieta normal (Nuvilab) (**Tabela 1**).

Após de 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 grupo controle e HFD receberam um veículo (tampão citrato pH 4,5).

Para aferir a glicemia plasmática, foi utilizado um glucômetro (Contour™ TS Bayer) e tiras de teste para glicose sanguínea (Bayer). Os animais com uma glicemia acima de 140 mg/dL foram considerados como diabéticos tipo 2 e foram utilizados para o estudo.

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



**Esquema 5:** Desenho experimental no CNTRL: Controle, HFD: High Fat Diet, STZ: Streptozotocin, DT2: Diabetes tipo 2.

	DIETA NORMAL	HFD
<b>LIPIDIOS (kcal%)</b>	<b>4,15</b>	<b>45</b>
<b>CARBOIDRATOS (kcal%)</b>	<b>46,18</b>	<b>35</b>
<b>PROTEINAS (kcal%)</b>	<b>27,73</b>	<b>20</b>
<b>Kcal/g</b>	<b>3,33</b>	<b>4,73</b>

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

#### 4.5. MEDIDA DA HIPERTROFIA CARDÍACA

Com o intuito de avaliar a existência de uma possível hipertrofia cardíaca nos animais de estudo, os corações foram pesados e normalizados pelo peso corporal e pelo comprimento da tíbia e foi calculada 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 sacrificados 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. 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. 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 deixados em jejum durante 6 horas. Após esse tempo, e antes da injeção de 2 g/kg animal de glicose, a glicemia foi aferida e após 15, 30, 60 e 120 min da injeção. Este teste mostra como está a captação de glicose, mas não indica se essa alteração na captação de glicose é devida a uma insuficiência na produção de insulina ou a uma insulina ineficiente. É por isso que 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, igual que no IPGTT, os animais foram deixados em jejum durante 4 horas e após esse tempo, e antes da injeção de 0,5 U/kg animal de insulina, a glicemia foi aferida e após 15, 30, 60 e 120 min da injeção.

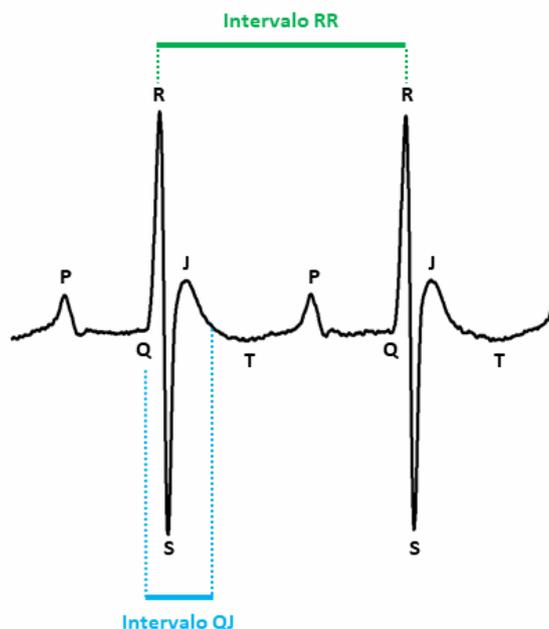
#### 4.7. REGISTROS DE ELETROCARDIOGRAMA (ECG)

A técnica padrão para estudar a atividade elétrica do coração é o eletrocardiograma (ECG) e é uma técnica utilizada comumente no diagnóstico do estado do coração.

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 I (DI) do ECG obtendo um registro como no mostrado no **esquema 6**. Os ECG foram registrados em animais acordados após um tempo mínimo de 24 horas de terem sido colocados os eletrodos para assim evitar a possível influência do anestésico nos registros.

No momento do registro, os conectores foram ligados por cabos flexíveis ao amplificador AC (modelo 1700, A-M Systems), utilizando o filtro a 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 pelo software Axoscope 9.0 (Axon Instruments, EUA). Foram analisadas as durações dos seguintes parâmetros: intervalo RR e intervalo QJ.



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

#### 4.8. PROTOCOLO DE ARRITMIAS

Para estudar a vulnerabilidades dos animais diabéticos a 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 Erickson e colaboradores (ERICKSON et al., 2013).

Para realizar o teste, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal 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 cafeína/dobutamina e foi registrado imediatamente o ECG durante 15 min.

Os eventos arrítmicos gerados durante esse intervalo foram identificados e quantificados em função da gravidade dos mesmos tal como descreveram Curtis e Walter e Erickson e colaboradores (CURTIS; WALKER, 1988; ERICKSON et al., 2013), sendo que de cada registro só 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).

#### **4.9. REGISTROS DE POTENCIAL DE AÇÃO (PA) DE CORAÇÃO INTACTO**

Sabe-se que o ECG representa o somatório dos potenciais de ação dos miócitos cardíacos, pelo 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 a traves do potencial de ação (PA).

O PA é o sinal produzido pelo cambio na voltagem da membrana da célula cardíaca durante um período de tempo. Essa mudança na voltagem se produz como resultado do movimento de íons através da membrana plasmática da célula.

Para realizar os registros de potencial de ação cardíaco 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) (**Esquema 7**).

Com o intuito de evitar o dano tissular pela formação de coágulos sanguíneos, os animais foram injetados com heparina sódica (i.p.) e sacrificados 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<sub>2</sub> 2; MgCl<sub>2</sub> 1; NaPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 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 vazio.

Uma vez canulado o coração, deixa-se estabilizar durante 5 minutos a temperatura ambiente com a solução Tyrode e a continuação ligamos a fonte de energia conectada a uma placa termoelétrica Peltier (TEC1-12706) a qual irá esquentar a solução da câmara.

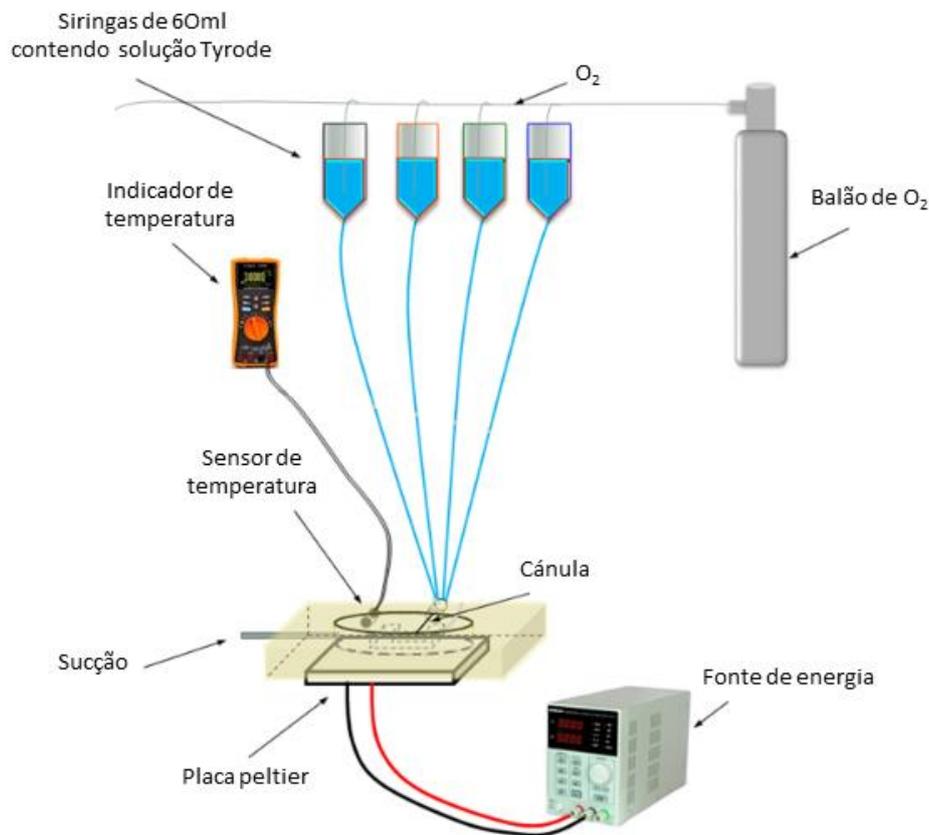
A contração mecânica do coração dificulta o registro dos potenciais de ação, por isso, antes de realizar os registros e durante os mesmos, os corações foram perfundidos com Tyrode junto com 4mM de Blebbistatina (Abcam) a qual inibe a interação actina-miosina sem alterar a atividade elétrica do coração (DOU; ARLOCK; ARNER, 2007).

Para registrar os sinais elétricos durante o potencial de ação, foram utilizados microeletrodos de vidro de borosilicato (resistência 10-40 MΩ) 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 na superfície do ventrículo esquerdo e antes de empalar o tecido a leitura do microeletrodo foi ajustado a zero.

Os sinais amplificados foram digitalizados (Digidata 1440A interface AD/DA system Axon Instrument) e armazenados no computador para posterior análise utilizando o software Clampfit 10.7 (Axon Instruments) e o programa LabChart 7.3 (ADInstruments).

Dentre os parâmetros analisados para os diferentes experimentos, encontram-se o potencial de repouso da membrana (RMP), amplitude do potencial de ação (APA), duração do potencial de ação a 30 e a 90% da repolarização (APD30 e APD90), triangulação (APD90-APD30) e velocidade da repolarização (Maximum Negative Slope).



**Esquema 7:** Esquema do sistema de perfusão retrograda de Langendorff.

#### 4.10. ISOLAMENTO DE CARDIOMIOCITOS

Com o objetivo de estudar as correntes iônicas mediante a 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 O<sub>2</sub>.

Para isolar os cardiomiócitos, inicialmente o coração foi perfundido com solução Tyrode contendo (em mM): NaCl 140; KCl 5,4; CaCl<sub>2</sub> 2; MgCl<sub>2</sub> 1; NaPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 0,33; HEPES 10 e glicose 10. O pH foi calibrado com NaOH em 7,4. Após de 5 min 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 collagenase tipo 2 e 0,1 mg/ml de protease tipo XIV. Finalmente, o coração foi perfundido com solução Tyrode sem cálcio durante 8 min com a finalidade de parar a digestão enzimática.

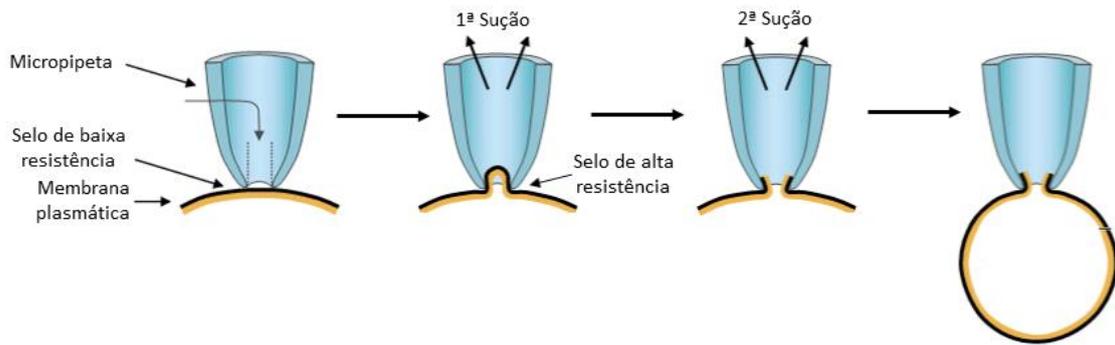
Finalizado o processo de digestão e lavagem, o coração foi removido do sistema de Langendorff e o ventrículo direito foi separado e disposto numa placa de vidro com solução Tyrode com 500 µM de CaCl<sub>2</sub>. Os cardiomiocitos foram obtidos mediante a realização de cortes transversais e agitação mecânica com pinças.

A suspensão de cardiomiocitos obtida foi guardada a 4°C por um período mínimo de 2h antes da obtenção dos registros eletrofisiológicos.

#### **4.11. REGISTRO DE CORRENTES IÔNICAS (PATCH CLAMP)**

As correntes iônicas foram registradas mediante a técnica de *Patch clamp* que permite registrar a atividade elétrica dos canais iônicos de vários tipos celulares. É a única técnica que permite estudar de maneira muito precisa os canais iônicos dependentes de voltagem, os quais são responsáveis do PA (ADELMAN; SENFT, 1966).

Para isso, os cardiomiócitos previamente isolados foram transferidos para uma placa de baixa profundidade montada num microscópio invertido (Leica Microsystems) 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* (**Esquema 8**) com um amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments Inc.), conectado a um conversor analógico digital Digidata 1200 (Axon Instruments Inc.). A frequência de aquisição foi de 10 kHz e filtrado a 5 kHz.



**Esquema 8:** Diagrama da configuração *whole-cell* da técnica de Patch clamp.

Para realizar os registros, foram fabricadas micropipetas de borosilicato (World Precision Instruments Inc.) utilizando uma microforja P-97 (Sutter Instruments) com uma resistência de entre 1-3 M $\Omega$  e preenchidas com uma solução chamada de solução interna contendo (em mM): L-Asp 80; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10; MgSO<sub>4</sub> 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 ficaram aderidas ao fundo da placa, começamos 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; MgCl<sub>2</sub> 1; HEPES-Na<sup>+</sup> 10; KCl 4; CaCl<sub>2</sub> 0,5; CoCl<sub>2</sub> 2; dextrose 12 e Cloreto de TEA 50. Para registrar as correntes  $I_{Ca-L}$  foi utilizada a seguinte solução externa (em mM): NaCl 86, MgCl<sub>2</sub> 1; KCl 4; HEPES-Na 10; CaCl<sub>2</sub> 1,8; glicose 12; TEA-Cl 50; 4-aminopiridina (4-AP) 4. Em ambas soluções externas, o pH foi ajustado para 7,4 com NaOH. Deixamos perfundindo essa solução durante 10 min 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, foi introduzida a micropipeta na solução do banho de células e descida até fazer contato com a célula. Depois, aplicamos uma primeira sucção com auxílio de uma seringa de 1ml 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 $\Omega$ ). Esse gigaselo é uma zona de contato entre a membrana e a pipeta que não permite a perda de cargas elétricas. Seguidamente, é aplicada 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 ao 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, fazendo 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.).

#### **4.11.1. Registro da corrente transitória de saída de potássio ( $I_{to}$ )**

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  $Co^{2+}$  que bloqueia a corrente de  $Ca^{2+}$ , e TEA, que bloqueia a corrente de  $K^+$  retificadora tardia. Além disso, o *holding potential* das células foi de -60 mV, potencial ao qual estão inativados os canais de  $Na^+$ .

Para registrar a corrente  $I_{to}$  aplicamos pulsos despolarizantes de 500 ms de duração, desde -30 até +50 mV com incrementos 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 sostenida ( $I_{ss}$ ). 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  $I_{to}$ , mas 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 picofaradio (pA/pF) e permite comparar amplitudes de  $I_{to}$  de células de tamanhos diferentes.

#### **4.12. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

A função cardíaca foi avaliada 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). 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*).

#### **4.13. DOSAGEM DOS NÍVEIS DE INSULINA:**

A concentração de insulina foi mesurada pela técnica de Radio imuno ensaio (RIA, do inglês Radioimmunassay) no soro dos camundongos do grupo WT CNTRL e WT T2D seguindo as instruções do fabricante do kit (MP Biomedical, USA).

#### **4.14. DETECÇÃO DE CITOCINAS:**

Para medir a concentração de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no soro dos camundongos, foi utilizado um kit de ELISA (R&D systems, USA). As leituras do ELISA foram feitas com o equipamento SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA).

#### **4.15. 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 sacrificados por deslocação 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 T<sup>a</sup> ambiente.

Os corações foram então cortados com auxílio de uma lâmina e lavados 5 vezes em 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; MgCl<sub>2</sub> 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.

A continuação, 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 pellet rico em mitocôndrias. Antes da terceira e última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido 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 pellet obtido foi ressuspensionado em 200 µl de tampão CP1.

As preparações de mitocôndrias isoladas obtidas foram submetidas a experimentos de oxigrafia de alta resolução 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.

#### **4.16. RESPIROMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO E MEDIDA DA PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> POR FLUORESCENCIA**

Para estudar o consumo de oxigênio mitocondrial nos diferentes estados respiratórios, foi utilizado um sistema de respirometria de alta resolução (O<sub>2</sub>k, OROBOROS Instruments). Por outro lado, a medida da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial foi aferida mediante espectrofotômetro de fluorescência.

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

A fim 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: 5mM Piruvato / 2.5mM Malato (substratos para o complexo I); 10mM Glutamato; 10µM ADP (que estimula o estado máximo fosforilativo); 1mM ADP saturante; 10mM succinato (substrato para o complexo II); 0,2µg/ml oligomicina (inibidor da ATP sintase que retorna o consumo de O<sub>2</sub> a valores próximos ao estado não fosforilativo em ausência de ADP) e 2µM antimicina A (inibidor do complexo III que permite avaliar o consumo de O<sub>2</sub> não mitocondrial ou residual).

Para medir a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial, as amostras mitocondriais foram colocadas na cubeta contendo 200µl de tampão de respiração MiR05 (do inglês mitochondrial respiratory solution 05) suplementado com 5µl de superóxido dismutase, 5,5µl de amplex red (Invitrogen) e 2 U/ml de peroxidase. O MiR05 está composto por (mM): EGTA 0,5; MgCl<sub>2</sub> 3; K-MÊS 60; taurina 20; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10; HEPES 20; sacarose 110 e 1 g/l BSA fat free. O pH foi calibrado para 7,1.

A peroxidase utiliza o amplex red como doador de elétrons para reduzir o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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; 0,2µg/ml oligomicina, 2 pulsos de 0,5µM de FCCP (protonóforo e desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial) e 2µM antimicina A.

#### **4.17. ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE (CS)**

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 foi adaptado daquele descrito por Eigentler e colaboradores e (EIGENTLER et al., 2012).

Assim, este 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  $\text{nmol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ .

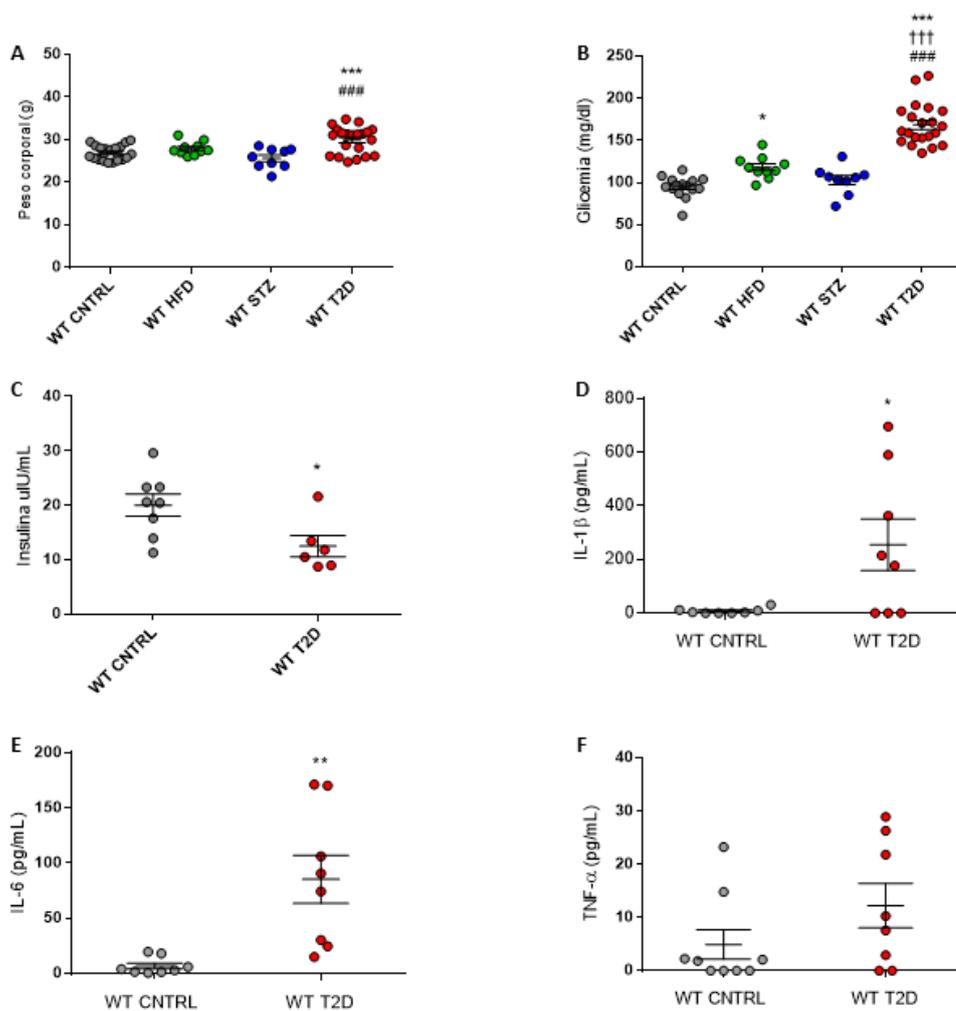
#### **4.18. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

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

## 5. RESULTADOS

### 1-ESTABELECE UM MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL DE DT2 UTILIZANDO HFD (45%) E BAIXA DOSE DE ESTREPTOZOTOCINA (STZ).

Após de 6 semanas do começo da indução a DT2 os animais foram submetidos a diversos exames bioquímicos para constatar o estado metabólico dos mesmos. Assim, os animais alimentados com HFD e injetados com duas doses de STZ (WT T2D), apresentaram um significativo aumento de peso corporal quando comparados tanto com os animais controle (WT CNTRL) quanto com aqueles que receberam alimentados só com HFD (WTHFD) ou com aqueles alimentados com dieta normal e injetados com duas doses de STZ (WT STZ) (**Fig. 1A**). Acompanhando esse resultado, houve um incremento na concentração de glicose em comparação com todos os grupos estudados (**Fig. 1B**) e uma diminuição na concentração de insulina nos soros desses animais, em relação ao grupo WT CNTRL (**Fig. 1C**). Em conjunto, esses resultados indicaram que o protocolo experimental de WT T2D promove alterações metabólicas consistentes com o desenvolvimento da doença estudada.

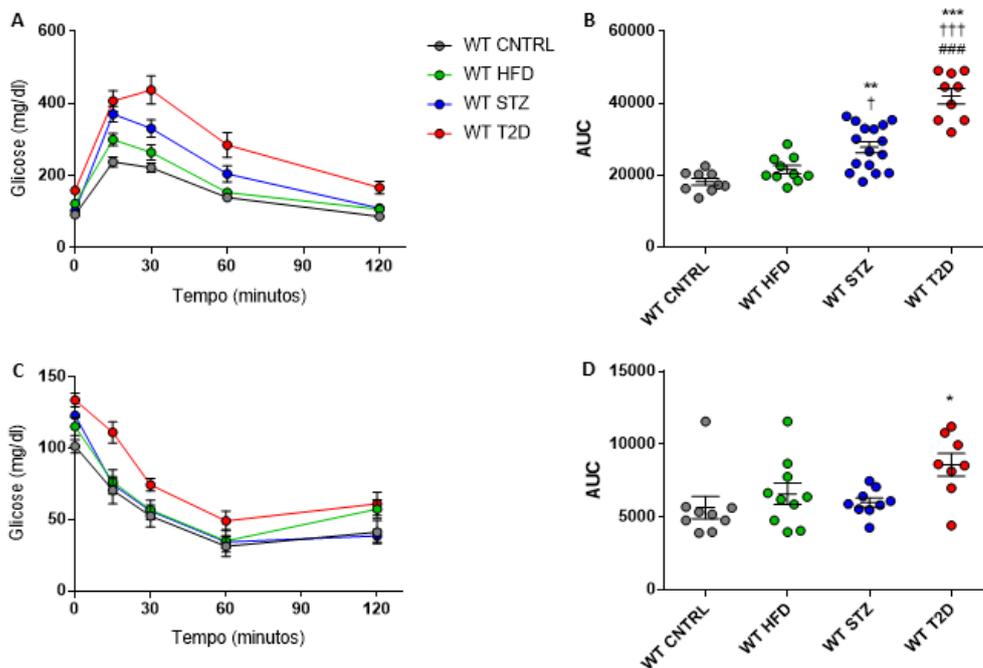


**Figura 1. Parâmetros biométricos e bioquímicos após 6 semanas do tratamento.** (A) Peso corporal dos grupos experimentais. (B) Concentração de glicose no sangue. (C) Concentração de insulina plasmática. Concentração de (D) IL-1 $\beta$ , (E) IL-6 e (F) TNF- $\alpha$  no soro dos animais WT CNTRL e WT T2D. Os resultados são apresentados como media  $\pm$  erro padrão da media. \*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 estudar os efeitos da dieta HFD em conjunto com as doses de STZ sobre a utilização de glicose foi avaliado a concentração desta em sangue após da administração de glicose exógena ou de insulina. A **Figura 2A** 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 T2D) apresentou maiores concentrações de glicose nos 30, 60 e 120 min após da administração.

Quantitativamente, esse resultado é indicado como a medição da área embaixo da curva (AUC). Nesse caso, embora o grupo WT STZ mostrasse um incremento 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. 2B**). Entretanto, para avaliar se a dificuldade de captar a glicose nesses animais está associada com a perda ou com a resistência à insulina, foi mensurada a concentração de glicose sanguínea em diferentes tempos após da administração de insulina exógena. As **Figuras 2C e 2D** 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 com os outros grupos experimentais.

Esses resultados (**Figuras 1 e 2**) mostraram que a combinação da dieta utilizada complementada com duas doses de STZ, promoveu um deterioro no 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.



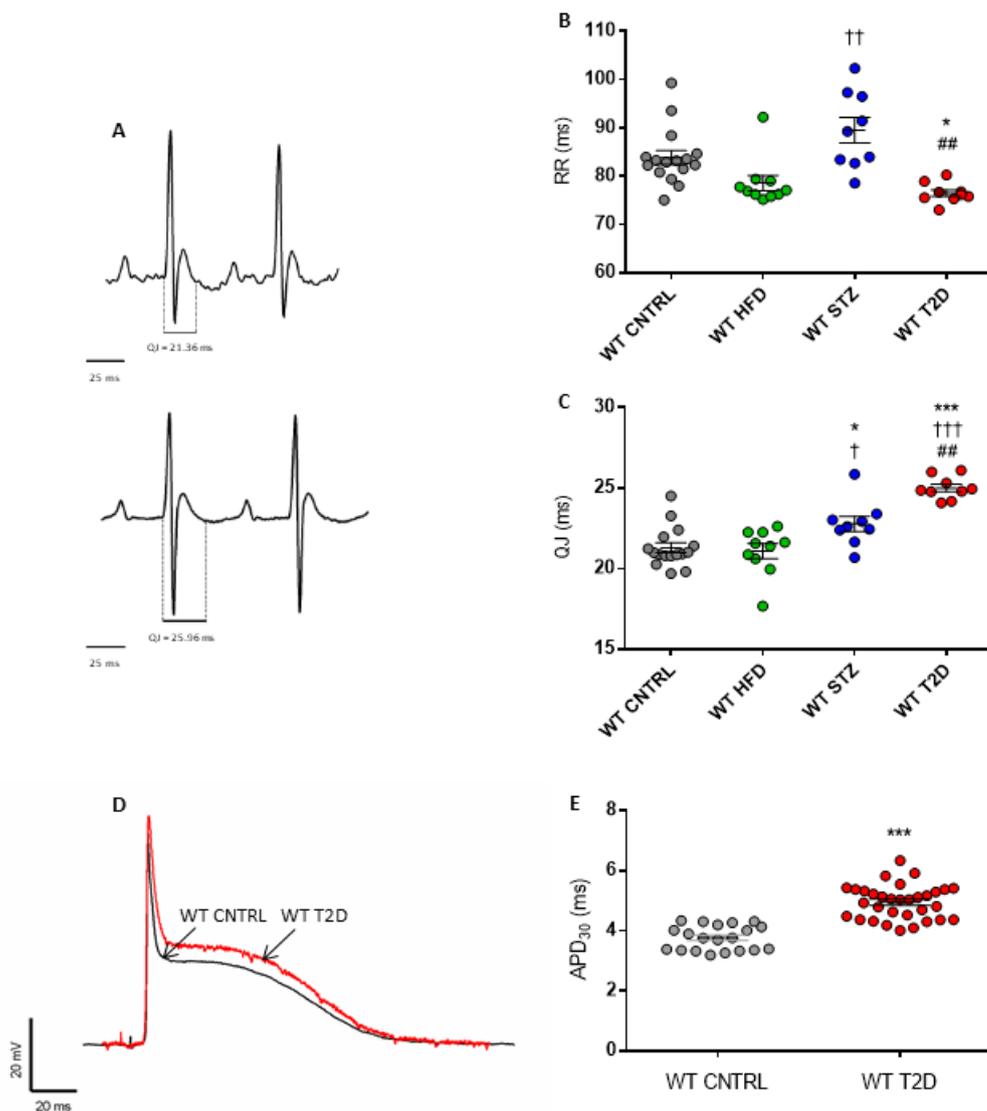
## 2-ESTUDAR AS ALTERAÇÕES ELÉTRICAS (ECG, PA) NO MODELO EXPERIMENTAL DE DT2.

Para investigar os efeitos da DT2 na funcionalidade elétrica cardíaca, foi realizado o eletrocardiograma *in vivo* nos animais de todos os grupos. A análise dos registros mostrou que os animais do grupo HFD+STZ apresentaram um maior intervalo QJ, quando comparado com os animais dos outros grupos, indicando possíveis alterações na repolarização ventricular. Não foram observadas diferenças no intervalo RR destes animais (**Fig. 3 A-C**). Para corroborar as alterações ventriculares, foi avaliado *ex vivo* o potencial de ação no coração inteiro nesses animais. Os resultados mostraram um prolongamento no potencial de ação ao 30% da repolarização ventricular nos animais DT2 quando comparados com os controles (**Fig. 3 D-E**). Dentre as correntes repolarizantes que compõem a fase I do potencial de ação (correspondente ao 30% da repolarização do ventrículo) encontra-se a corrente de saída de potássio denominada Ito. Para estudar como o DT2 impacta na funcionalidade desta 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 (**Fig. 4 A-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.

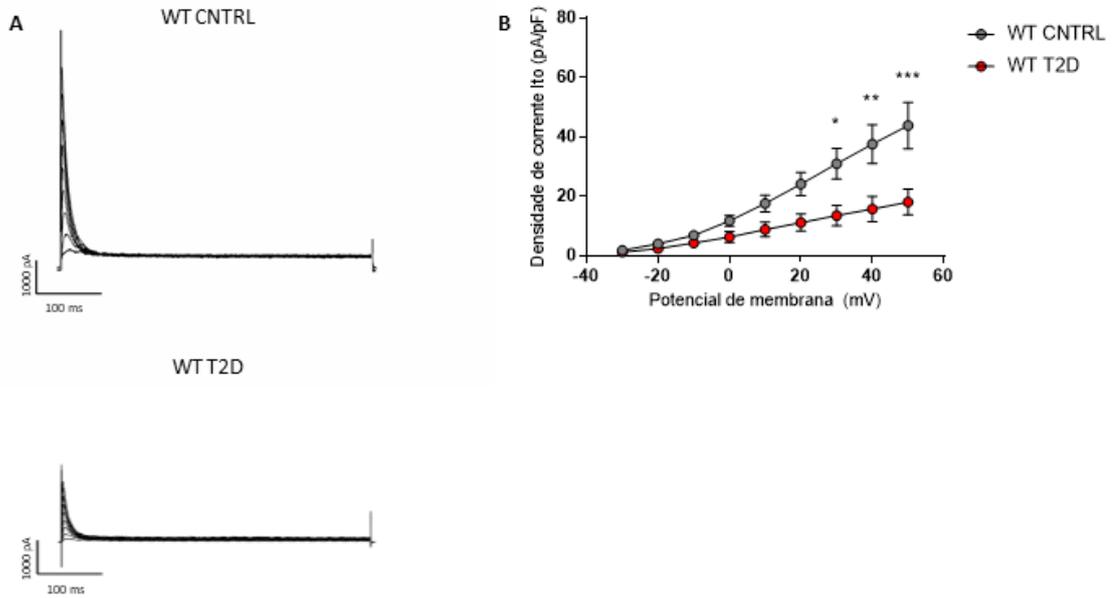
### 3- IDENTIFICAR OS MECANISMOS IÔNICOS SUBJACENTES AS ALTERAÇÕES ELÉTRICAS OBSERVADAS.

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 predisposição e gravidade de eventos arrítmicos. Os resultados mostraram que o modelo de DT2 promove o desenvolvimento de arritmias cardíacas em comparação ao estado controle (Fig. 5 A-B).

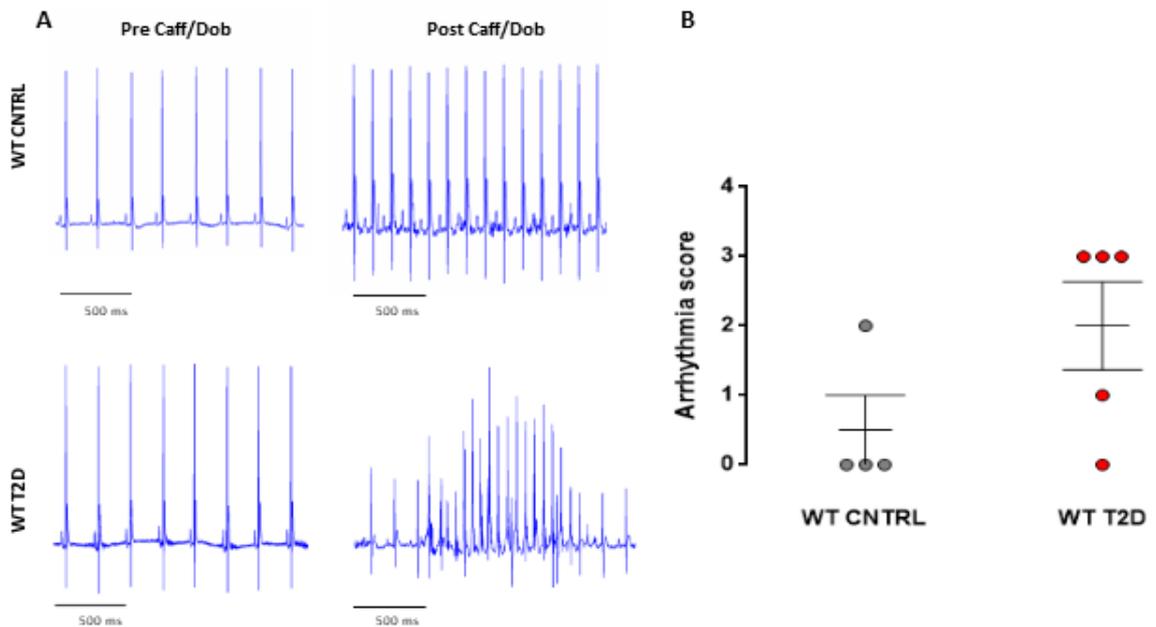


**Figura 3: Parâmetros elétricos (ECG e PA) após 6 semanas de tratamento.** (A) Traçados representativos do ECG dos animais do grupo WT CNTRL (acima) e WT T2D (abaixo) indicando a duração do intervalo QJ. (B) Gráfico da duração do intervalo RR (C) e do intervalo QJ de todos os grupos experimentais. (D) Traçados representativos do PA do grupo WT CNTRL (preto) e WT T2D (vermelho). (E) Gráfico da duração do PA ao 30% da repolarização (APD<sub>30</sub>). Os resultados são apresentados como média ± 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.



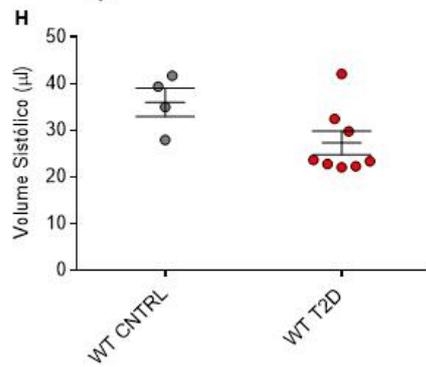
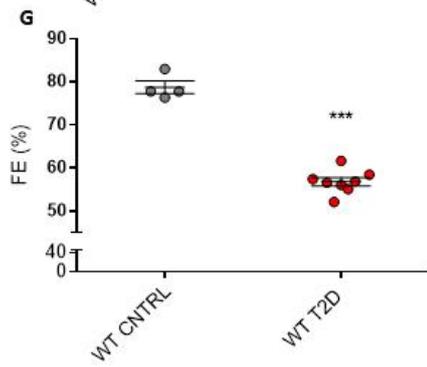
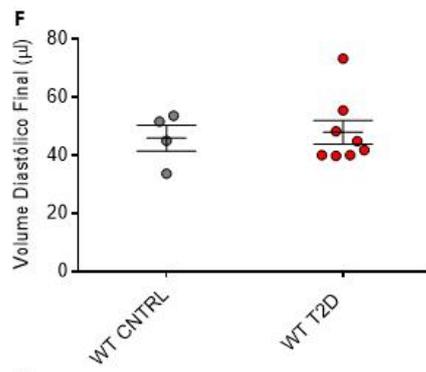
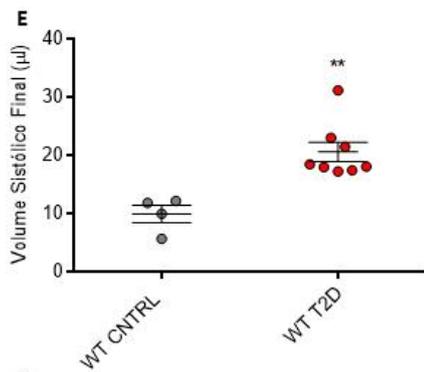
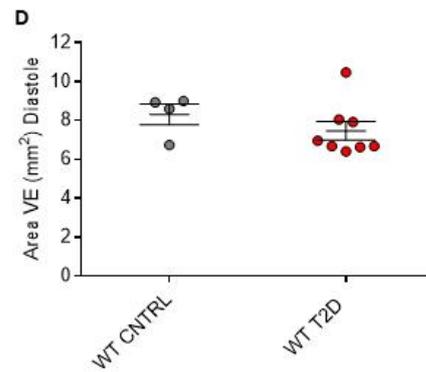
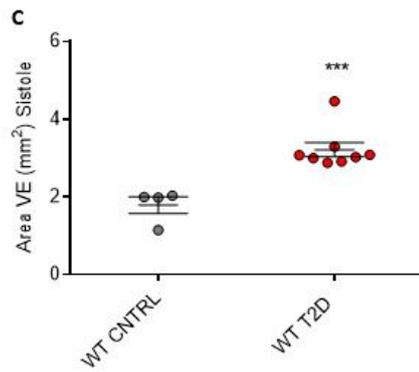
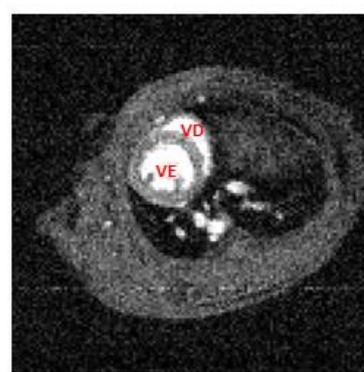
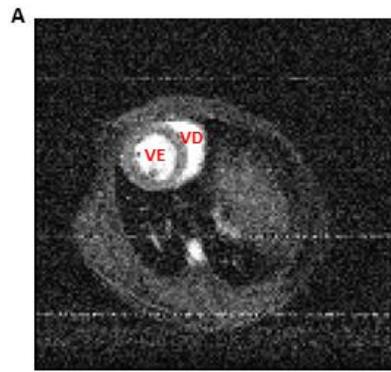
**Figura 4: Parâmetros elétricos (Patch Clamp) após 6 semanas de tratamento.** (A) Registro da corrente Ito nos cardiomiócitos isolados dos corações de camundongos WT CNTRL (acima) e WT T2D (abaixo). (B) Gráfica da densidade da corrente Ito em função do potencial de membrana dos cardiomiócitos dos animais WT CNTRL e WT T2D. Resultados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Figura 5: Papel do DT2 na vulnerabilidade a desenvolver arritmias cardíacas.** (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 T2D (abaixo). (B) Gráfica 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.

#### **4- ESTUDAR AS ALTERAÇÕES MECÂNICAS SUBJACENTES AS ALTERAÇÕES ELETRICAS OBSERVADAS.**

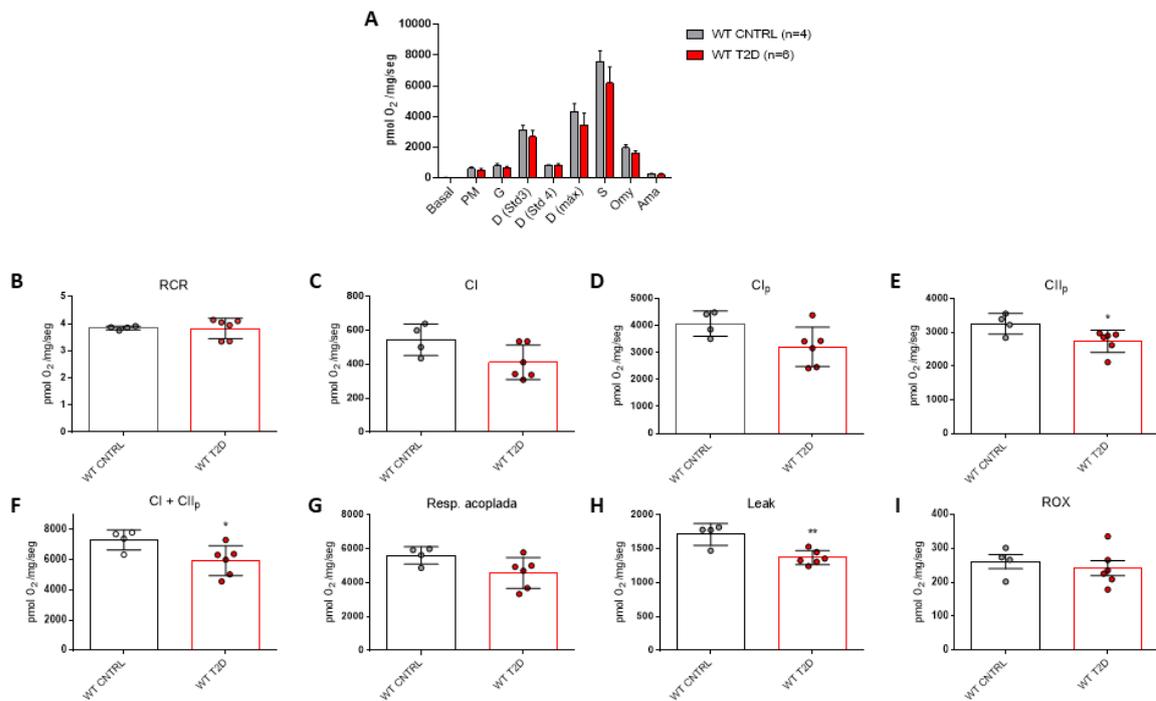
Para avaliar os efeitos do DT2 sobre a função cardíaca, foi avaliada a mecânica ventricular mediante RMN nos animais WT CNTRL e WT T2D (**Figura 6**). Os animais diabéticos apresentaram uma disfunção cardíaca evidenciada pela redução da fração de ejeção (**Fig. 6G**) a qual foi refletida também nos parâmetros da área do ventrículo esquerdo (**Fig. 6 C-D**), sendo significativamente maior no animais do grupo WT T2D na sístole, no volume diastólico e sistólico final (**Fig. 6 E-F**), sendo este último maior nos animais WT T2D, e no débito sistólico (**Fig. 6H**).



**Figura 6: Papel do DT2 nas alterações mecânicas.** Imagens de seções transversais de corações dos camundongos do grupo WT CNTRL (A) e WT T2D (B) adquiridas por RMN. Área do ventrículo esquerdo (VE) na sístole (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  $\pm$  erro padrão da média. \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

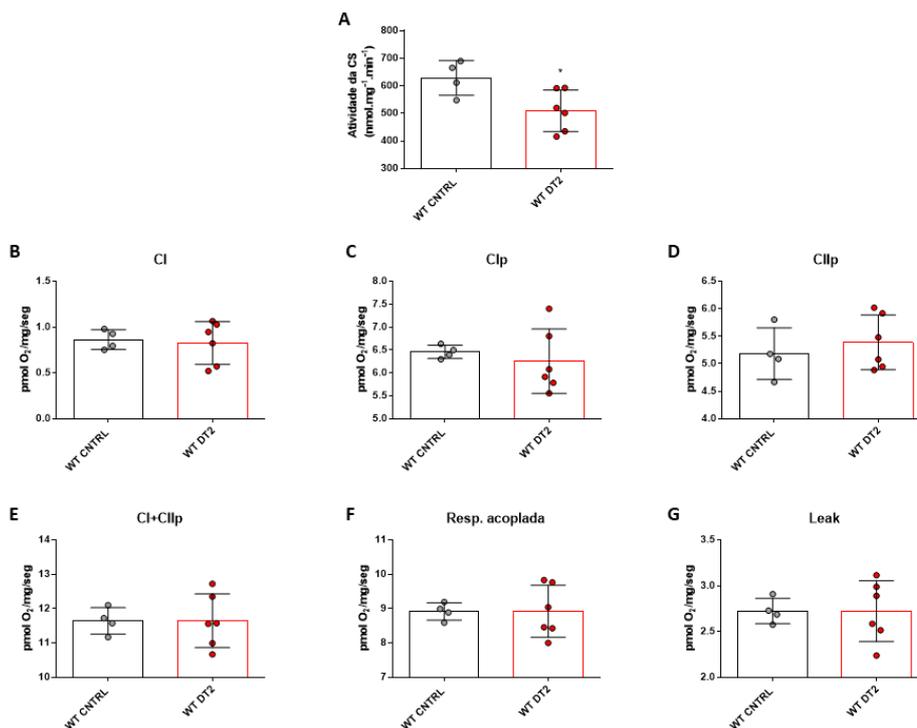
## 5 - INVESTIGAR O CONSUMO DE OXIGÊNIO SUPORTADO PELOS DIFERENTES SUBSTRATOS DO SISTEMA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS (STE), MENSURAR A PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> E QUANTIFICAR A ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE.

Para avaliar o consumo de oxigênio mitocondrial nos diferentes estados respiratórios, foi utilizado um sistema de respirometria de alta resolução. Os resultados obtidos (**Fig. 7**) mostraram que o consumo de O<sub>2</sub> nos animais WT DT2 está diminuído, principalmente nos complexos I e II do STE (**Fig. 7 C-F**). Além disso, o vazamento inespecífico de prótons (Leak) foi menor nos animais WT DT2 (**Fig. 7H**).



**Figura 7: Consumo de O<sub>2</sub> 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 no fosforilativo na presença de piruvato/malato normalizado pela atividade CS. (D) Consumo de oxigênio no estado fosforilativo em presença de glutamato normalizado pela atividade CS (E) Consumo de oxigênio em presença de succinato normalizado pela atividade CS (F) Consumo de oxigênio na presença de piruvato/malato + succinato normalizado pela atividade CS (G) Consumo de oxigênio acoplado à síntese de ATP normalizado pela atividade CS. (H) Vazamento inespecífico de prótons (*Proton Leak*) normalizado pela atividade CS. (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 um 20% nos animais WT DT2 quando comparados com os WT CNTRL (**Fig. 8A**). Assim, quando normalizados os valores do consumo de O<sub>2</sub> pelos diferentes substratos do STE (**Fig. 8B-G**), vemos que as diferenças observadas desaparecem, sugerindo que o efeito observado no consumo de O<sub>2</sub> é basicamente em função da redução do conteúdo mitocondrial.

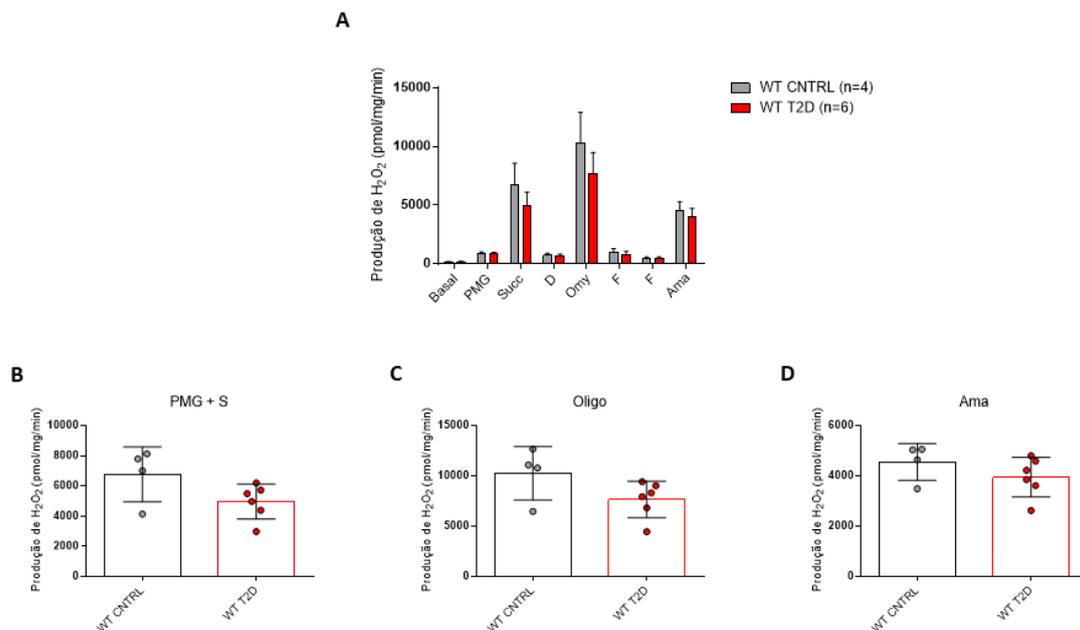


**Figura 8: Atividade da citrato sintase (CS).** (A) Quantificação da atividade CS nos animais WT CNTRL e WT DT2. (B) Consumo de oxigênio no estado no fosforilativo na presença de piruvato/malato normalizado pela atividade CS. (C) Consumo de oxigênio no estado fosforilativo em presença de glutamato normalizado 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  $\pm$  erro padrão da média.

Os processos oxidativos estão involucrados com a patogêneses, progressão e complicações do DM. Assim, a hiperglicemia crônica e o subsequente aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) produzem um deterioro das células  $\beta$  pancreáticas incrementando a resistência à insulina (KANETO et al., 2010). A principal fonte geradora 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 **figura 9A** 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  $H_2O_2$  de nos animais WT DT2 quando comparados com os animais WT CNTRL (**Fig. 9B-D**).



**Figura 9: 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.

## 6 - ESTUDAR O PAPEL DO SISTEMA IMUNE INATO NO DT2.

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 (do inglês toll-like receptors), como mostrado no **esquema 7**; NF- $\kappa$ B e inflamossoma com

consequente aumento na secreção de citocinas pro-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  dentre outras (DEVARAJ; TOBIAS; JIALAL, 2011).

Neste contexto, Monnerat & L. Alarcón mostraram que no DT1 a ativação do TLR2 e inflamossoma NLRP3 intercede na produção de IL-1 $\beta$  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 tendência a desenvolver arritmias cardíacas. Assim, foi mostrado que essas arritmias observadas no DT1 podem ser tratadas inibindo o eixo IL-1 $\beta$  mostrando assim que a IL-1 $\beta$  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 $\beta$  (LEE et al., 2013).

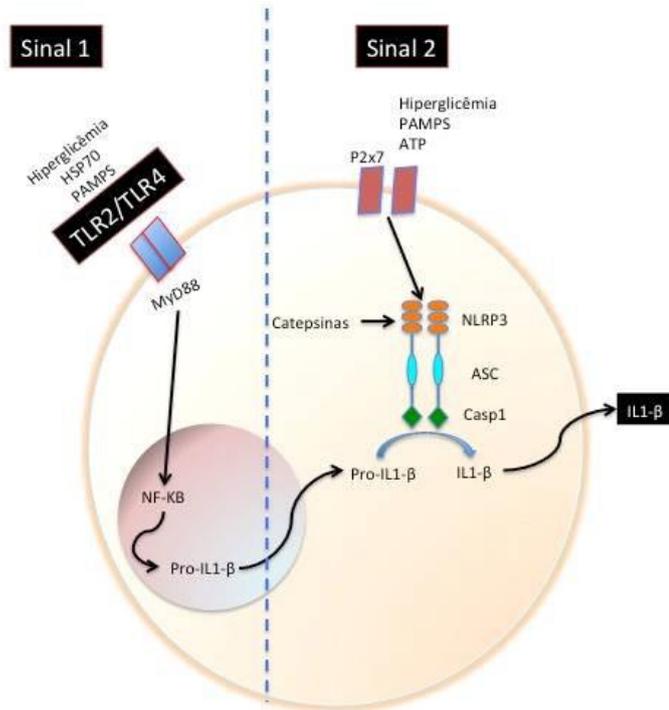
Com esses antecedentes, fomos avaliar se no nosso modelo animal de DT2, inibindo as moléculas do eixo IL-1 $\beta$  como NLRP3, CASP1 e IL1R, utilizando camundongos *knock-out* (KO) para as mesmas; esses acometimentos cardíacos observados no DT2 podem ser revertidos.

Para isso, camundongos KO C57bl/6 para NLRP3, CASP1 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: 2 semanas após do início da dieta (dieta estandar para os animais CNTRL e HFD para os animais DT2), os animais do grupo DT2 dos respectivos grupos KO (NLRP3<sup>-/-</sup>, CASP1<sup>-/-</sup>, e IL1R<sup>-/-</sup>) receberam 2 injeções de STZ (40 mg/kg) separadas 24 horas uma da outra. 4 semanas após a injeção, foram realizados os estudos biométricos, bioquímicos e eletrocardiográficos pertinentes.

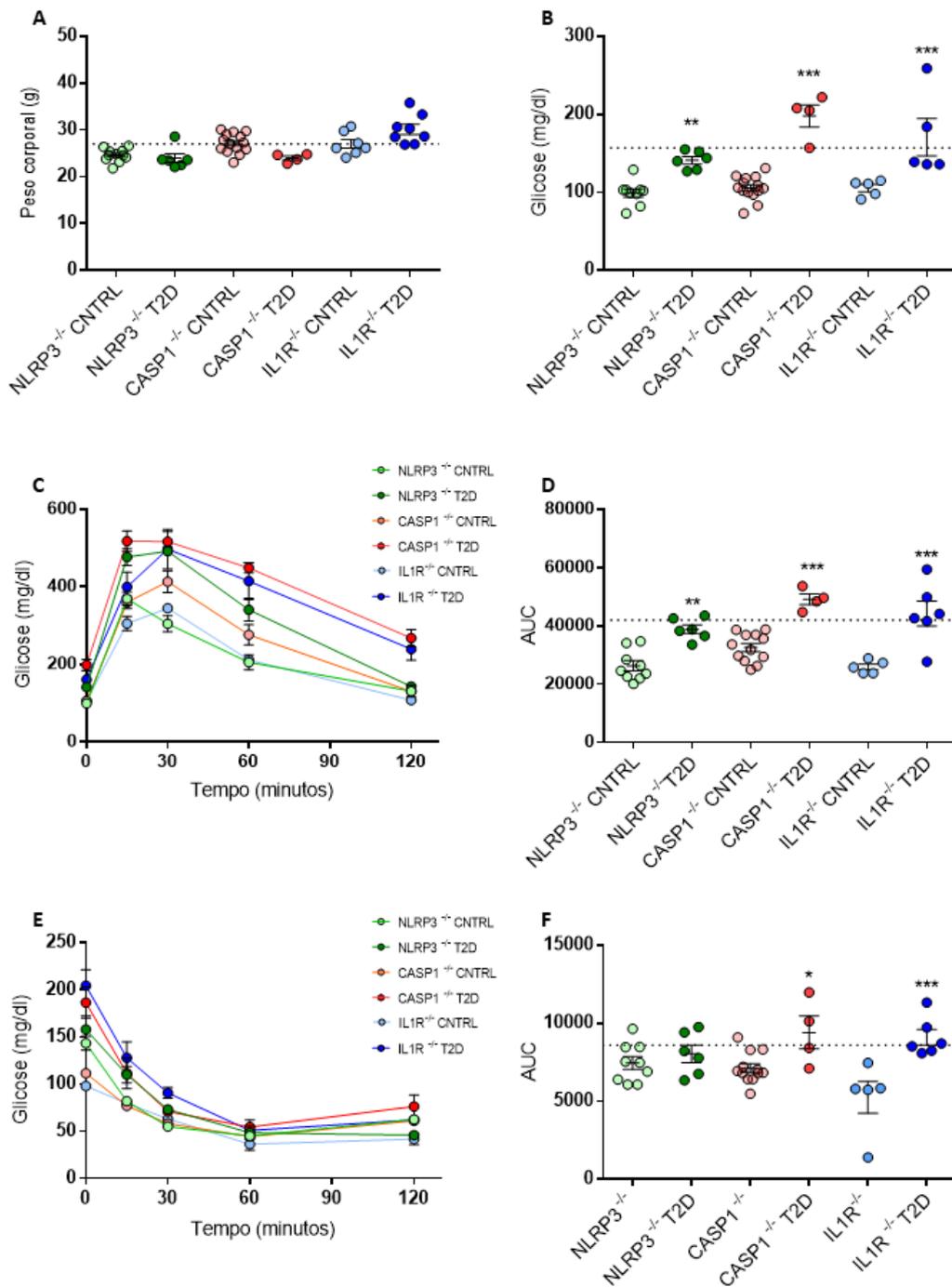
Assim, os animais alimentados com HFD e injetados com duas doses de STZ (T2D), não apresentaram um aumento do peso corporal quando comparados com os animais controle (CNTRL) (**Fig. 7A**). Porém, houve um incremento na concentração de glicose em todos os grupos T2D estudados quando comparados com os seus respectivos controles (CNTRL) (**Fig. 7B**) e esses níveis de glicose foram semelhantes aos observados nos animais DT2 selvagens (linha ponteadada).

Por outro lado, quando realizados o IPGTT (**Fig. 7 C-D**) e IPITT (**Fig. 7 E-F**), todos os grupos DT2 mostraram um aumento na concentração de glicose após 15, 30, 60 e 120 minutos da administração de glicose (**Fig. 7C**) e insulina (**Fig. 7E**) exógena. Esses resultados indicados como a medição da área embaixo da curva (AUC) foram maiores nos animais KO dos grupos 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.

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.



Esquema 9: Representação da ativação do inflamossoma NLRP3 pela via do TLR.



**Figura 10: Parâmetros biométricos e bioquímicos dos animais KO para 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 respetivamente. (D e F) AUC dos correspondentes testes de IPGTT e IPITT respetivamente. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparando o respetivo grupo KO DT2 com seu controle.

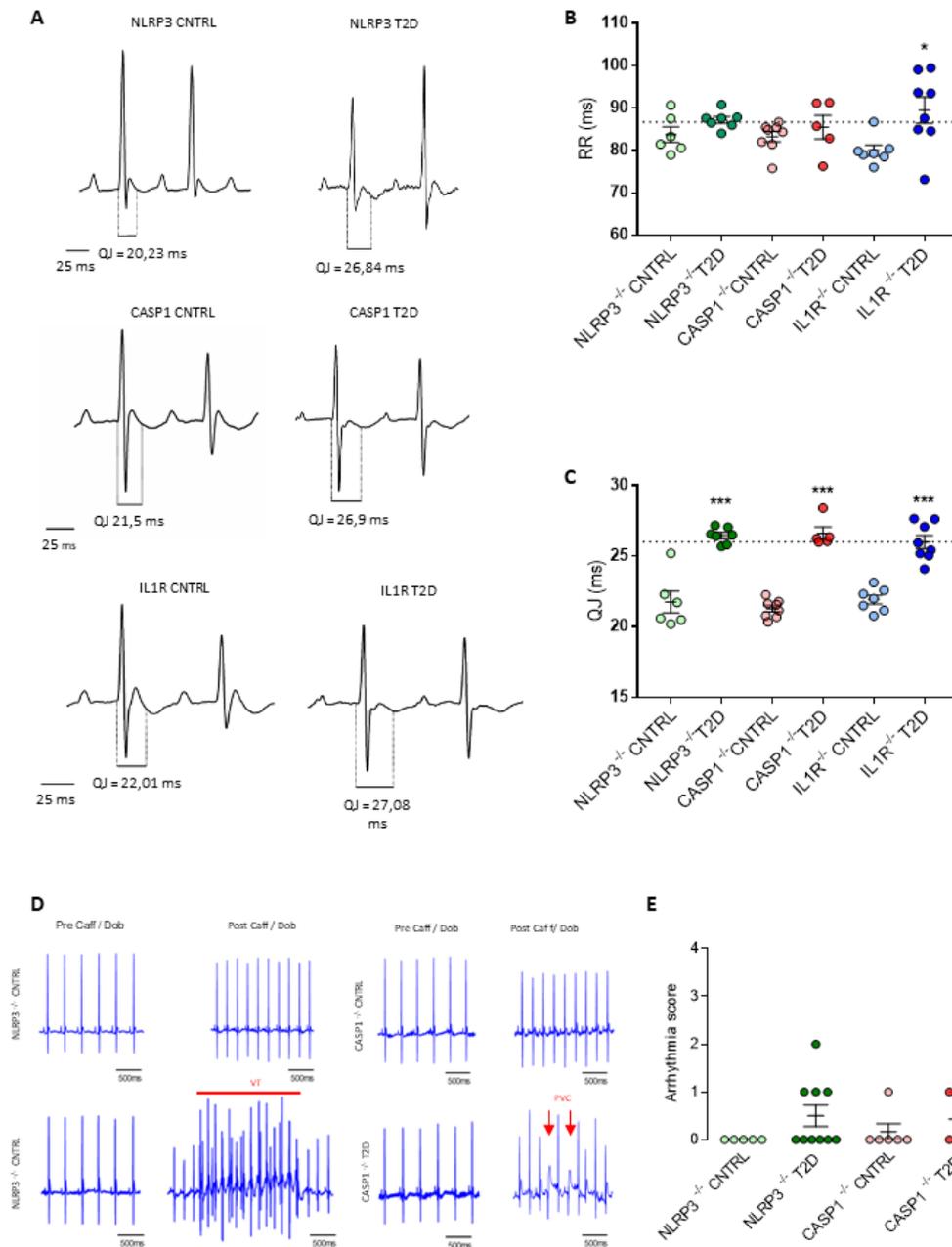
Uma vez definido o perfil metabólico dos animais KO, fomos avaliar se a inibição das moléculas chave da via do IL-1 $\beta$  melhora o perfil cardíaco e as alterações

observadas nos animais WT DT2. Para isso, igual que foi feito com os animais selvagens, foi realizado o ECG *in vivo* (**Figura 8 A-C**) e foi estudada a vulnerabilidade a desenvolver arritmias cardíacas mediante o protocolo que combina uma dose intraperitoneal de cafeína (120 mg/kg) e uma dose intravenosa de dobutamina (50 µg/kg) da mesma maneira que foi feito com os animais selvagens.

Assim, foi observado em todos os grupos KO DT2 um aumento no intervalo QJ (**Fig. 8C**) com valores semelhantes aos observados nos animais selvagens (linha pontuada) e não houve diferenças na frequência cardíaca (representada pelo intervalo RR, como mostrado na **Fig. 8B**). Porém, os animais IL1R<sup>-/-</sup> mostraram um aumento no intervalo RR mostrando que nesses animais diminui a frequência cardíaca.

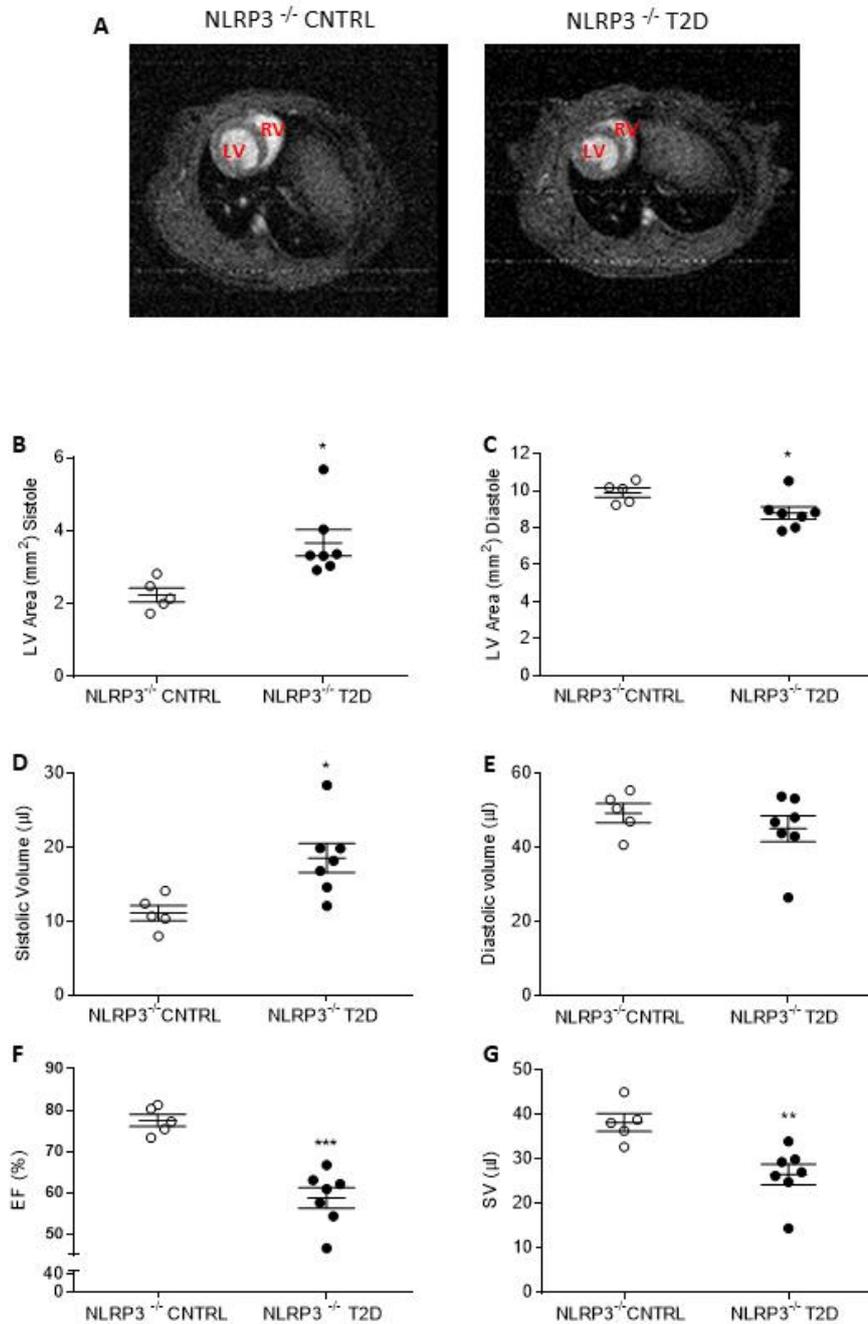
Por outro lado, quando realizado o teste de vulnerabilidade a arritmias cardíacas (**Fig. 8 D-E**), foi observado que os animais NLRP3<sup>-/-</sup> DT2 e CASP1<sup>-/-</sup> DT2 mostraram maior quantidade de eventos arrítmicos quando comparados com seus controles. Porém, a severidade e quantidade desses eventos é melhor que o observado nos animais WT DT2.

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



**Figura 11: Parâmetros elétricos dos animais KO para NLRP3, CASP1 e IL1R após 6 semanas de tratamento.** (A) Traçados representativos do ECG dos animais CNTRL e DT2 dos animais NLRP3<sup>-/-</sup>, CASP1<sup>-/-</sup> e IL1R<sup>-/-</sup>. (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<sup>-/-</sup> (esquerda) e CASP1<sup>-/-</sup> (direita). (E) Gráfica 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 (**Figura 9**) observando disfunção cardíaca evidenciada pela redução da fração de ejeção (**Fig. 9F**), assim como uma redução na área do ventrículo esquerdo tanto na sístole quanto na diástole (**Fig. 9 B-C**), um aumento no volume sistólico (**Fig. 9D**) e diminuição do débito cardíaco (**Fig. 9G**). Esse resultado demonstra que pelo menos a via do inflamossoma NLRP3 parece não estar envolvida nas alterações mecânicas observadas no DT2.



**Figura 12: 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<sup>-/-</sup> CNTRL (esquerda) e NLRP3<sup>-/-</sup> T2D (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 tipo 2 (DT2) é uma síndrome caracterizada principalmente por uma hiperglicemia crônica e resistência à insulina. Essa resistência à insulina é uma situação clínica induzida por fatores genéticos e por fatores adquiridos cuja principal manifestação é o síndrome metabólico. Com o transcurso do tempo, muitos pacientes com síndrome metabólico desenvolvem DT2 o qual deriva em problemas cardiovasculares e alterações elétricas cardíacas como prolongamento do intervalo QTc ou aumento na dispersão desse intervalo (QTd). Essas alterações estão associadas com o incremento no risco de desenvolver alterações do ritmo cardíaco (arritmias), o qual explica a maior incidência de morte súbita nestes pacientes (COX et al., 2014; STETTLER et al., 2007).

Apesar de que mais do 90% dos pacientes diabéticos apresentam DT2, todos os trabalhos experimentais em eletrofisiologia tem sido realizados em modelos animais de DT1. A explicação para esse fato é a carência de um bom modelo animal que reproduza o mais fielmente possível o DT2 do paciente humano.

Por isso, Reed e colaboradores, no ano 2000, desenvolveram um modelo animal de DT2 que combina uma dieta hiperlipídica (HFD) e uma dose de estreptozotocina (STZ) a qual leva a desenvolver o síndrome metabólico primeiro e destruição parcial das células  $\beta$  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 humano, principalmente a glicemia elevada, porém menos que no DT1, hiperlipidemia e a resistência à insulina (TI et al., 2011).

Com o objetivo de estudar as alterações tanto elétricas quanto mecânicas observadas nos pacientes com DT2, neste projeto de tese utilizamos esse modelo animal descrito por Reed e colaboradores porém modificado, administrando 2 doses de STZ de 40 mg/kg de animal separadas 24 horas uma da outra em vez de uma única dose de 50 mg/kg como descrito por Albersen e colaboradores (ALBERSEN et al., 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 alterações nos parâmetros biométricos como aumento do peso corporal; e bioquímicos, como aumento dos níveis de glicose em sangue (porém não tão elevados quanto no modelo animal de DT1). Além disso, quando realizados os testes de tolerância à glicose e insulina, IPGTT e IPITT respectivamente, esses animais mostraram resistência à insulina. Essa característica, junto com o aumento da glicose sanguínea definem o DT2, confirmando que nosso modelo conseguiu reproduzir a situação diabética humana do DT2.

A hiperglicemia não controlada pode contribuir à suscetibilidade a infecção e inflamação refletida no aumento da concentração de citocinas pro-inflamatórias (SAUKKONEN et al., 2018). Acompanhando essa afirmação, nossos resultados mostraram que DT2 existe um aumento das mesmas, principalmente IL-1 $\beta$  e IL6.

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

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 vem dada pela onda J (EMORI; ANTZELEVITCH, 2001).

Previamente, no ano 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).

Em nosso modelo de DT2 observamos um aumento no intervalo QJ quando comparados com os animais controle, um aumento na duração do PA ao 30% da repolarização, que representa a fase 1 do PA, e uma diminuição da densidade da corrente  $I_{to}$ , principal corrente nesta fase do PA. Essas alterações na repolarização ventricular potencializaram o desenvolvimento de eventos arrítmicos observados nos animais WT DT2.

Juntilla e colaboradores já mostraram que alterações na repolarização temprana predizem eventos arrítmicos principalmente taquicardias ventriculares (JUNTTILA 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 taquicardias ventriculares.

Além de estudar as alterações cardíacas nos 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. Essa fração de ejeção é a quantidade de sangue (expressado como porcentagem) que expulsado do ventrículo esquerdo em cada batimento cardíaco. Ela é mensurada avaliando os câmbios no lúmen do ventrículo e assim, nós observamos um aumento da área do ventrículo esquerdo na sístole o qual explicaria essa diminuição na FE.

O DT2 é associado com hipertensão arterial e doença arterial coronariana. Ele é um fator de risco para desenvolver infarto do miocárdio e a disfunção e 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. Essa fração de ejeção é a quantidade de sangue (expressado como porcentagem) que expulsado do ventrículo esquerdo em cada batimento cardíaco. Ela é mensurada avaliando os câmbios no lúmen do ventrículo e assim, nós observamos um aumento da área do ventrículo esquerdo na sístole o qual explicaria essa diminuição na FE.

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).

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 da produção 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.

Finalmente, sabendo que no nosso modelo de DT2 existe um aumento da produção de IL-1 $\beta$  e baseado no estudo de Monnerat e L. Alarcón sobre o papel do sistema imune no DT1 (MONNERAT et al., 2016), fomos estudar se em nosso modelo de DT2 ao inibir as moléculas do eixo IL-1 $\beta$  como NLRP3, CASP1 e IL1R os acometimentos cardíacos observados podem ser revertidos.

Os resultados obtidos mostraram que a ausência de NLRP3, CASP1 ou IL1R não preveniram as alterações elétricas nem mecânicas sugerindo que a produção de IL-1 $\beta$  associada à disfunção cardíaca no DT2 acontece por outra via.

A ativação do sistema imune e a liberação de citocinas pro inflamatórias definem as alterações agudas e crônicas cardíacas (EPELMAN; LIU; MANN, 2015). Essas citocinas pioram o remodelamento cardíaco mediante efeitos destrutivos nos cardiomiócitos e na matriz extracelular. As tentativas para melhorar o estado dos pacientes mediante inibição dessas citocinas pro inflamatórias não conseguiram reverter essas alterações e em alguns casos até exacerbaram a insuficiência cardíaca (HEYMANS et al., 2009).

Observando nossos resultados, podemos pensar que as alterações cardíacas observadas no DT2 não são devidas ao aumento da produção de IL-1 $\beta$  podendo estas estar associadas com outras citocinas.

Neste contexto, Amit e colaboradores descreveram pela primeira vez o papel do receptor 1 $\alpha$  da interleucina-13 na homeostase miocárdica e insuficiência cardíaca

(AMIT et al., 2017). Esses autores mostraram que a IL-13R $\alpha$ 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. Assim, podemos pensar que as alterações observadas em nosso modelo de DT2 poderiam estar associadas com essa via sugerindo um novo alvo terapêutico para tratar essas alterações.

## 7. 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;
- ✓ 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 aqui observadas.

## 8. REFERENCIAS

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, nov. 1966.

AFANASYEVA, M. et al. 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, mar. 2004.

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

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

ALAM, U. et al. General aspects of diabetes mellitus. In: *Handbook of Clinical Neurology*. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 126p. 211–222.

ALBERSEN, M. et al. 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, ago. 2011.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, v. 38 Suppl, p. S8–S16, jan. 2015.

AMIT, U. et al. New Role for Interleukin-13 Receptor  $\alpha$ 1 in Myocardial Homeostasis and Heart Failure. *Journal of the American Heart Association*, v. 6, n. 5, 20 maio 2017.

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

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, dez. 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, 2014.

CASIS, O. et al. Effects of diabetic cardiomyopathy on regional electrophysiologic characteristics of rat ventricle. *Diabetologia*, v. 43, n. 1, p. 101–109, jan. 2000.

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

CHATZIGEORGIU, A. et al. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo* (Athens, Greece), v. 23, n. 2, p. 245–258, abr. 2009.

COX, A. J. et al. Heart rate-corrected QT interval is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in individuals with type 2 diabetes: the Diabetes Heart Study. *Diabetes Care*, v. 37, n. 5, p. 1454–1461, maio 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, set. 1988.

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, set. 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, set. 2007.

EIGENTLER, A. et al. Laboratory protocol: Citrate synthase. A mitochondrial marker enzyme. [s.l: s.n.]. v. 1704

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, dez. 2001.

EPELMAN, S.; LIU, P. P.; MANN, D. L. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nature Reviews. Immunology*, v. 15, n. 2, p. 117–129, fev. 2015.

ERICKSON, J. R. et al. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*, v. 502, n. 7471, p. 372–376, 17 out. 2013.

ERNANDE, L. 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: Official Publication of the American Society of Echocardiography*, v. 24, n. 11, p. 1268- 1275.e1, nov. 2011.

GALLEGO, M. et al. Reduced calmodulin expression accelerates transient outward potassium current inactivation in diabetic rat heart. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, v. 22, n. 5–6, p. 625–634, 2008.

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

GOLBIDI, S.; ALIREZA EBADI, S.; LAHER, I. Antioxidants in the Treatment of Diabetes. *Current Diabetes Reviews*, v. 7, n. 2, p. 106–125, 1 mar. 2011.

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

GRUNDY, S. M. et al. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*, v. 100, n. 10, p. 1134–1146, 7 set. 1999.

HEYMANS, S. 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, fev. 2009.

IDF Diabetes Atlas 8th edition. , 2017.

JØRGENSEN, P. G. 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. 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, out. 2014.

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

KANETO, H. et al. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, v. 2010, p. 453892, 2010.

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, jun. 2012.

KOVACIC, J. C. et al. The Relationships Between Cardiovascular Disease and Diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, v. 43, n. 1, p. 41–57, mar. 2014.

LARSEN, S. 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, 15 jul. 2012.

LEE, H.-M. et al. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, v. 62, n. 1, p. 194–204, jan. 2013.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.

LUO, J. et al. Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 47, n. 6, p. 663–668, jun. 1998.

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

MEJÍA-ALVAREZ, R. 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, mar. 2003.

MONNERAT, G. et al. Macrophage-dependent IL-1 $\beta$  production induces cardiac arrhythmias in diabetic mice. *Nature Communications*, v. 7, p. 13344, 24 nov. 2016.

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

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

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, jul. 2012.

REED, M. J. et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 49, n. 11, p. 1390–1394, nov. 2000.

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

ROBILLON, J. F. et al. Assessment of cardiac arrhythmic risk in diabetic patients using QT dispersion abnormalities. *Diabetes & Metabolism*, v. 25, n. 5, p. 419–423, nov. 1999.

SAUKKONEN, 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, 24 ago. 2018.

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, abr. 1979.

SRINIVASAN, K. et al. 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, out. 2005.

STETTLER, C. et al. QTc interval and resting heart rate as long-term predictors of mortality in type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 23-year follow-up. *Diabetologia*, v. 50, n. 1, p. 186–194, jan. 2007.

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, mar. 2014.

TI, Y. et al. TRB3 gene silencing alleviates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetic rat model. *Diabetes*, v. 60, n. 11, p. 2963–2974, nov. 2011.

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

TORRES-JACOME, J. et al. Improvement of the metabolic status recovers cardiac potassium channel synthesis in experimental diabetes. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, v. 207, n. 3, p. 447–459, mar. 2013.

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, jan. 2011.

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, dez. 2006.

VEGLIO, M. 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, abr. 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, 26 jul. 2014.

WHITE, M. F. Insulin signaling in health and disease. *Science (New York, N.Y.)*, v. 302, n. 5651, p. 1710–1711, 5 dez. 2003.

XU, Z. et al. Up-regulation of K(+) channels in diabetic rat ventricular myocytes by insulin and glutathione. *Cardiovascular Research*, v. 53, n. 1, p. 80–88, jan. 2002.

YAN, G. X.; ANTZELEVITCH, C. Cellular basis for the electrocardiographic J wave. *Circulation*, v. 93, n. 2, p. 372–379, 15 jan. 1996.

YIN, F. C. et al. 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, dez. 1982.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, v. 414, n. 6865, p. 782–787, 13 dez. 2001.