



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



YGOR SCHLEIER FRANCISCO DAS CHAGAS

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

Rio de Janeiro

Novembro, 2019

Ygor Schleier Francisco das Chagas

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

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

Orientador: Prof. Dr. Emiliano Medei

Rio de Janeiro

Novembro de 2019

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

Autor desconhecido

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Agradeço a coordenadora Glaucia de Oliveira e ao programa de pós-graduação em Cardiologia da UFRJ pela oportunidade de realizar meu trabalho e por estar sempre disposta a me ajudar em qualquer circunstância.

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

Resumo

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

Introdução: O Diabetes *mellitus* do tipo I (DMI) é uma doença ocasionada pela destruição das células- β pancreáticas nas ilhotas de *Langerhans*, que resulta em uma deficiência na produção de insulina, provocando altos níveis de glicemia e disfunção de diferentes órgãos, incluindo o coração. O remodelamento elétrico cardíaco é característico em pacientes diabéticos crônicos, os quais apresentam alterações na repolarização ventricular e arritmias cardíacas, importantes preditores de morte súbita. O DMI também é caracterizado por uma inflamação exacerbada, fazendo com que receptores do tipo toll4 (TLR4) aumentem sua atividade e disparem cascatas de sinalização culminando em maior liberação de citocinas pró-inflamatórias.

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

Métodos: Animais NOD fêmeas foram utilizados 4 semanas após a detecção de hiperglicemia e comparados com seu respectivo controle NOR. Também utilizamos camundongos C57BL/6 machos e fêmeas induzidos por STZ (50mg/kg) por 5 dias consecutivos, assim como animais TLR4^{-/-} de ambos os sexos após 8 semanas da indução. A atividade eletrocardiográfica foi estudada *in vivo* na derivação D1. A vulnerabilidade a desenvolver arritmias cardíacas foi avaliada mediante um protocolo *in vivo* que combina cafeína (120 mg/kg i.p) e dobutamina (50 μ g/kg i.v).

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

quando comparados ao seu controle NOR. No modelo de STZ, optamos por realizar um estudo dependente de gênero e nos machos encontramos o intervalo QJ aumentado ($20,98 \pm 0,3$ vs $26,45 \pm 0,3$ ms) refletindo em uma maior susceptibilidade de desenvolver arritmias. Ao analisarmos as fêmeas podemos observar um aumento do Intervalo PR ($33,39 \pm 0,5$ vs $37,13 \pm 0,3$ ms) assim como o QJ ($21,00 \pm 0,3$ vs $23,03 \pm 0,4$ ms) e maior pré-disposição a desenvolver arritmia. Ao utilizarmos animais TLR4^{-/-} de maneira sexo-específico para o estudo da modulação eletrocardiográfica, observamos que os machos apresentaram aumento do intervalo QJ ($21,01 \pm 0,3$ vs $26,16$ ms). Surpreendentemente as fêmeas TLR4^{-/-} conseguiram prevenir as alterações elétricas cardíacas. Tendo ambos os sexos prevenidos a ocorrência de arritmias cardíacas.

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

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

Abstract

DAS CHAGAS, YgorSchleier Francisco. **Studyoftheresponseimmuneinnate inelectrocardiographicalteration in the type 1 diabetes model: Role of tlr4.** Rio de Janeiro, Julho, 2019. Masters dissertation, Medicine (Cardiology), Hospital UniversitárioClementinoFragaFilho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

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

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

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

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

comparation with selfie control (NOR). STZ model, we chose to perform a gender-dependent study and in the males we found the QJ interval increased (20.98 ± 0.3 vs 26.45 ± 0.3 ms) reflecting a greater susceptibility to develop arrhythmias. When we analyzed the females we observed increase the PR interval (33.39 ± 0.5 vs 37.13 ± 0.3 ms) as well as QJ (21.00 ± 0.3 vs 23.03 ± 0.4 ms) and a higherpre-disposition to develop arrhythmia. When using TLR4^{-/-} animals in a sex-specificmanner for the study of electrocardiographic modulation, we observed that males showed na increase in QJ interval (21.01 ± 0.3 vs 26.16 ms). Surprisingly, TLR4^{-/-}females were able to prevent cardiac electrical changes. Having both sexes prevented the occurrence of cardiac arrhythmias.

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

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativa mundial de novos casos de diabetes.....	4
Figura 2 – Modelo de ativação do inflamossoma NLRP3 via TLR's e clivagem e liberação de IL-1 β	9
Figura 3- Mecanismos propostos mediante a ativação dos receptores TLR4 ..	10
Figura 4 - Traçado representativo do eletrocardiograma em camundongo	18
Figura 5 - Traçado representativo durante indução de arritmia utilizando Cafeína e Dobutamina.Traçado representativo durante o protocolo de arritmia através da administração de cafeína e dobutamina. (adaptado de Monnerat. G et al, 2017)	19
Figura 6 – Animais NOD apresentam alterações metabólicas e biométricas na 18 ^o semana.....	25
Figura 7 – O modelo NOD gera um remodelamento elétrico cardíaco	26
Figura 8 – Animais NOD apresentam maior vulnerabilidade a arritmias ventriculares	27
Figura 9 - O modelo NOD não gera alterações na função ventricular	28
Figura 10 = Mitocôndrias cardíacas consomem mais O ₂ no modelo NOD	29
Figura 11 - O complexo IV mitocondrial está diminuído na fosforilação oxidativa em animais NOD	30
Figura 12 - O TLR4 não esta envolvido nas alterações biométricas e metabólicas em camundongos machos	32
Figura 13 - O TLR4 não esta envolvido nas alterações biométricas e metabólicas em camundongos fêmeas.....	33
Figura 14 – A falta de TLR4 em camundongos machos não preveniu o aumento do intervalo QJ.....	34
Figura 15 - Fêmeas TLR4 ^{-/-} previnem o aumento do intervalo QJ no modelo de DMI.....	35
Figura 16 – A falta do receptor TLR4 preveniu a severidade de arritmias em ambos os gêneros.....	36
Figura 17 - Machos apresentam maior expressão de receptores TLR4 em comparação com fêmeas.....	37
Figura 18 - Fêmeas TLR4 ^{-/-} apresentam uma redução da expressão dos receptores de estrogênio em corações.	38

Figura 19 - Parâmetros biométricos e metabólicos em animais ovariectomizados	39
Figura 20 - Parâmetros elétricos dos camundongos ovariectomizados.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs: Produtos finais da glicação avançada, do Inglês *Advancedglycationendproducts*

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

APA: Amplitude do potencial de ação ASC: Proteína associada a apoptosis, do Inglês Apoptosis-associatedspeck-likeprotein

ATP: Adenosina trifosfato

CaMKII: Calmodulina dependente de quinase II

CASP1: Caspase-1 do Inglês Caspase activation and recruitmentdomains1

DC: Doenças cardiovasculares

DM: Diabetes Mellitus

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

DMI: Diabetes Mellitus tipo I

DMII: Diabetes Mellitus tipo II

E: Estrógeno

ER: Receptores de estrogênio

FFAs: Ácidos graxos livres, do Inglês Freefattyacids

HLA: Antigênico leucocitário humano, do Inglês Humanleukocyteantigen

IAA: Autoanticorpo contra insulina, do Inglês Insulinautoantibodies

IC: Insuficiência Cardíaca

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

IL: Interleucina

IL-1 β : Interleucina-1 β

IL-6 – Interleucina-6

IM – Infarto do Miocárdio

IRF3: Fator de transcrição regulatório de interferon 3

LPS: Lipopolisacarídeo

Ito: Corrente de repolarizante de saída de potássio, do Inglês
TransientOutwardPotassiumCurrent

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

MCD: Miocardiopatia diabética

MyD88: Proteína de diferenciação mielóide 88

NAD: Neuropatia Autonômica Diabética

NCX: Trocador sódio-cálcio

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

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

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

PA: Potencial de ação

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

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

PKC: Proteína kinase C

ROS: Espécies reativas do oxigênio, do Inglês Reactiveoxygenspecies

RyR2: Receptor de rianodina subtipo 2

SERCA: Proteína Ca²⁺ ATPase sarcoplasmática

STZ: Estreptozotocina

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

TLR: Receptores de tipo toll

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TRIF: Dominio adaptador TIR de indução ao interferão β do Inglês TIR-domaincontainingadapter-inducinginterferon- β

VT: Taquicardia ventricular; do Inglês Ventricular tachycardia

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

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.2 DIABETES MELLITUS	3
1.3 DIABETES <i>MELLITUS</i> DO TIPO I.....	4
1.4 DIABETES <i>MELLITUS</i> DO TIPO II.....	5
1.5 CARDIOMIOPATIA DIABÉTICA	6
Diabetes Mellitus e o sistema imune inato.....	7
1.6 HIPERGLICEMIA E SISTEMA IMUNE INATO	7
1.7 HIPERGLICEMIA E ATIVAÇÃO DO EIXO TLR4/NLRP3/IL-1 β	8
1.8 PAPEL DO SISTEMA IMUNE INATO NAS ALTERAÇÕES ELÉTRICAS CARDIACAS	9
1.9 RESPOSTA SEXO ESPECIFICA NA IMUNIDADE INATA.....	11
1.10 DIMORFISMO SEXUAL E DIABETES	12
1.11 FUNÇÃO MITOCONDRIAL E DMI	13
2. HIPOTESE DO TRABALHO	14
3. OBJETIVO GERAL DO TRABALHO.....	15
3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	15
4. MATERIAS E MÉTODOS	16
4.1 ANIMAIS	16
4.2 MODELO EXPERIMENTAL (Diabetes Mellitus do Tipo I)	16
4.3 MEDIDAS DE HIPERTROFIA CARDÍACA E UTERINA	17
4.4 CIRURGIA DE OVARECTOMIA (OVX).....	17
4.5 ELETROCARDIOGRAMA E TESTE DE VULNERABILIDADE A ARRITMIAS	18
4.6 – ECOCARDIOGRAMA.....	19
4.7 - ISOLAMENTO MITOCONDRIAL.....	20
4.8 - RESPIROMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO E MEDIDA DA PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂ POR FLUORESCENCIA.....	21
4.9 - PCR em tempo Real (qPCR).....	22
4.10 – WESTERN BLOT	23
4.11 - Análise Estatística	23
5. RESULTADOS	24
5.1 - ESTUDO DOS PARAMETROS BIOMÉTRICOS E METABÓLICOS NO MODELO NOD.....	24
5.2 - AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ELÉTRICAS EM ANIMAIS NOD	25
5.3 - ESTUDO DO POTENCIAL ARRITMOGÊNICO EM ANIMAIS NOD	26
5.4 - ESTUDO DA FUNÇÃO VENTRICULAR EM ANIMAIS NOD.....	27

5.5 - ESTUDO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO E PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂	28
5.6 – ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTEICA DOS COMPLEXOS MITOCONDRIAIS EM CORAÇÃO DE ANIMAIS NOD.....	29
5.7 – ANÁLISES BIOMÉTRICAS E METABÓLICAS EM ANIMAIS MACHOS	31
5.8 – ANÁLISES BIOMÉTRICAS E METABÓLICAS EM ANIMAIS FÊMEAS.....	32
5.9 – ANÁLISES ELÉTROCARDIOGRÁFICAS EM ANIMAIS MACHOS.....	33
5.10 – ANÁLISES ELETROCARDIOGRÁFICAS EM ANIMAIS FÊMEAS.....	34
5.11 – ANÁLISE SEXO-ESPECÍFICO DO POTENCIAL ARRITMOGÊNICO.....	35
5.12 – EXPRESSÃO GÊNICA DOS RECEPTORES TLR4 EM MACHOS E FÊMES	36
5-13 – AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO NO CORAÇÃO	37
5.14 – ESTUDO DOS PARAMETROS BIOMÉTRICOS E METABÓLICOS EM ANIMAIS OVZ.....	38
5.15 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ELETROCARDIOGRÁFICOS EM ANIMAIS OVZ	39
6. Discussão	42
7. Conclusão	46
8. Referências Bibliográficas	47

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

Pacientes crônicos com DM apresentam disfunções em diversos órgãos e sistemas. Dentre esses distúrbios associados à hiperglicemia destacam-se as doenças isquêmicas, remodelamentos mecânicos e elétricos do coração, além da exacerbação da resposta inflamatória local e sistêmica (Katsarou *et al.*, 2017) (Suyset *et al.*, 2006) (Gupta *et al.*, 2017) (Dogan *et al.*,

2006).

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

Nas ultimas décadas o número de novos casos de DM cresceu exponencialmente, fazendo com que essa enfermidade se tornasse um dos principais problemas relacionados à saúde pública. Nesse cenário, diversos grupos de pesquisa vêm se propondo a realizar estudos que visam ajudar a compreender melhor a fisiopatologia do DM. Para a realização desses estudos na área básica já são utilizados alguns modelos: O modelo de STZ, que já é vastamente utilizado em inúmeros trabalhos e o modelo NOD, que são animais transgênicos que desenvolvem DMI de maneira espontânea. Através dessas ferramentas nosso grupo buscou realizar uma caracterização da função elétrica e funcional desses animais. Preenchendo uma lacuna referente aos animais NOD na literatura.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2 DIABETES MELLITUS

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

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

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

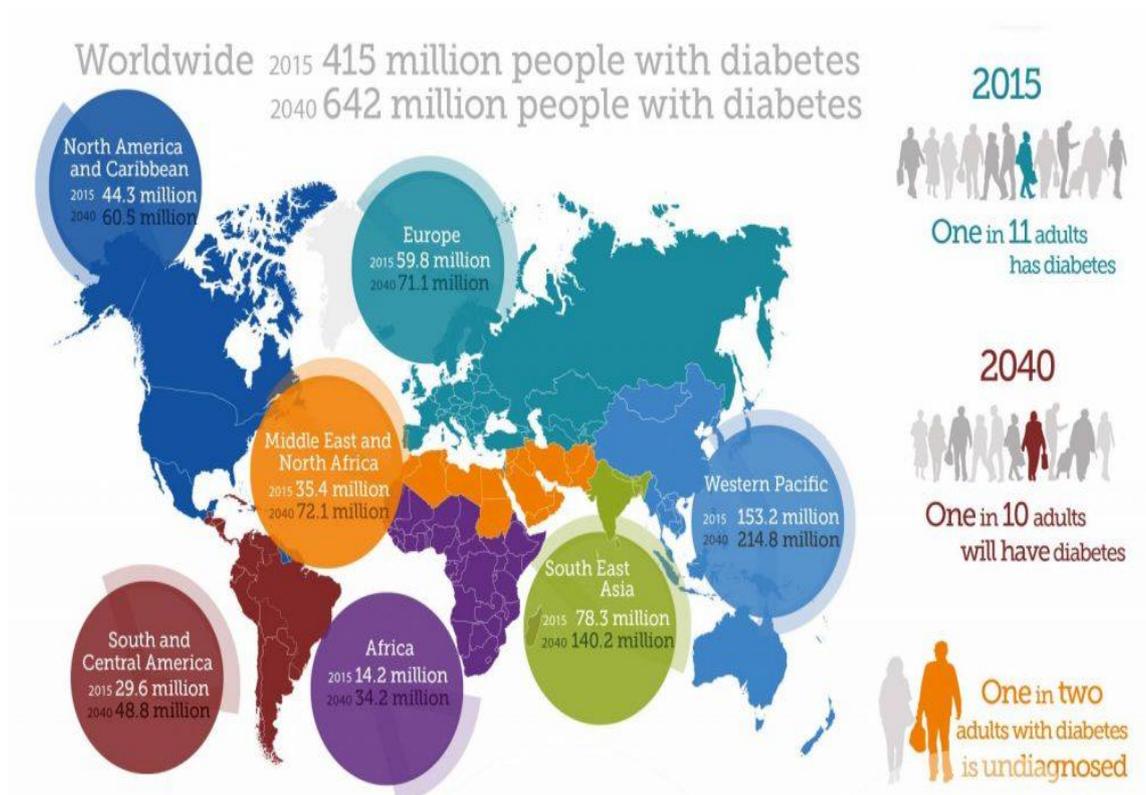


Figura 1 - Estimativa mundial de novos casos de diabetes - De acordo com o mapa podemos observar a distribuição de casos diagnosticados de diabetes em cada continente. São estimados que 1 adulto entre 10 possui diabetes onde 1 adulto entre 2 não possui diagnóstico. Fonte: IDF ATLAS (2016)

1.3 DIABETES MELLITUS DO TIPO I

No DMI, existe uma produção de auto-anticorpos que levam a destruição das células beta pancreáticas nas ilhotas de *Langherans*, resultando na insuficiência da produção de insulina. Esta doença de etiologia ainda debatida, entretanto de predominância auto-imune tende acometer principalmente crianças e adolescentes, totalizam aproximadamente 10% dos casos no mundo. Estima-se que aproximadamente 1.4 milhões de pessoas nos EUA vivam com DMI, ocorrendo de maneira desordenada o aumento da sua incidência em todo o mundo (Schmidt, Valeri e Leslie, 2005).

As doenças autoimunes como o DMI afetam 20% da população mundial. As principais causas envolvidas nessas patologias são as intensificações das respostas do sistema imune tanto inato como adaptativo, aos quais levam a ativação de macrófagos e dos linfócitos T e B, ocasionando a produção de

anticorpos (Bach et al, 2002).

Uma das principais alterações envolvidas na suscetibilidade do desenvolvimento do DMI são as alterações referentes aos antígenos leucocitários humanos (HLA). Atribuindo-se 50% de sua hereditariedade a mutações referentes a esse gene (Noble and Valdes, 2011).

Importantes marcadores são imprescindíveis no diagnóstico desta doença, e nesse cenário os anticorpos anti-insulina (IAA) são considerado um dos mais eficazes marcadores para diagnóstico em crianças menores de 5 anos. Entretanto, em idades mais avançadas o IAA perde sua sensibilidade. Nesse contexto, através de estudos foi estabelecido como o mais sensível e eficaz na detecção do DMI os anticorpos contra a descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD65) (Barinas-Mitchell, et al, 2006).

1.4 DIABETES *MELLITUS* DO TIPO II

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

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

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

Hábitos alimentares, assim como o sedentarismo estão envolvidos com o desenvolvimento e progressão desta doença. O DMII comumente aparece em idades tardias, podendo ou não estar associado à obesidade. Esse fato pode estar atrelado aos hábitos de vida (Israili, 2011).

1.5 CARDIOMIOPATIA DIABÉTICA

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

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

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

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

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

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

Diabetes Mellitus e o sistema imune inato

1.6 HIPERGLICEMIA E SISTEMA IMUNE INATO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

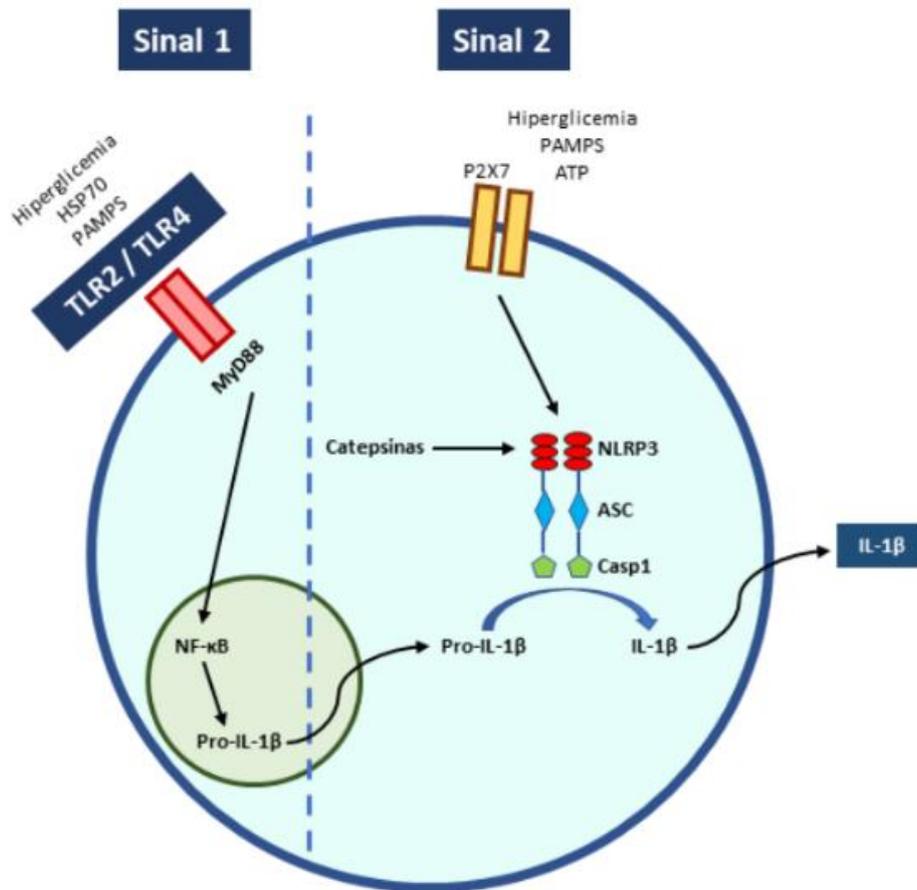


Figura 2 – Modelo de ativação do inflamossoma NLRP3 via TLR's e clivagem e liberação de IL-1 β

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

1.8 PAPEL DO SISTEMA IMUNE INATO NAS ALTERAÇÕES ELÉTRICAS CARDIACAS

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

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

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

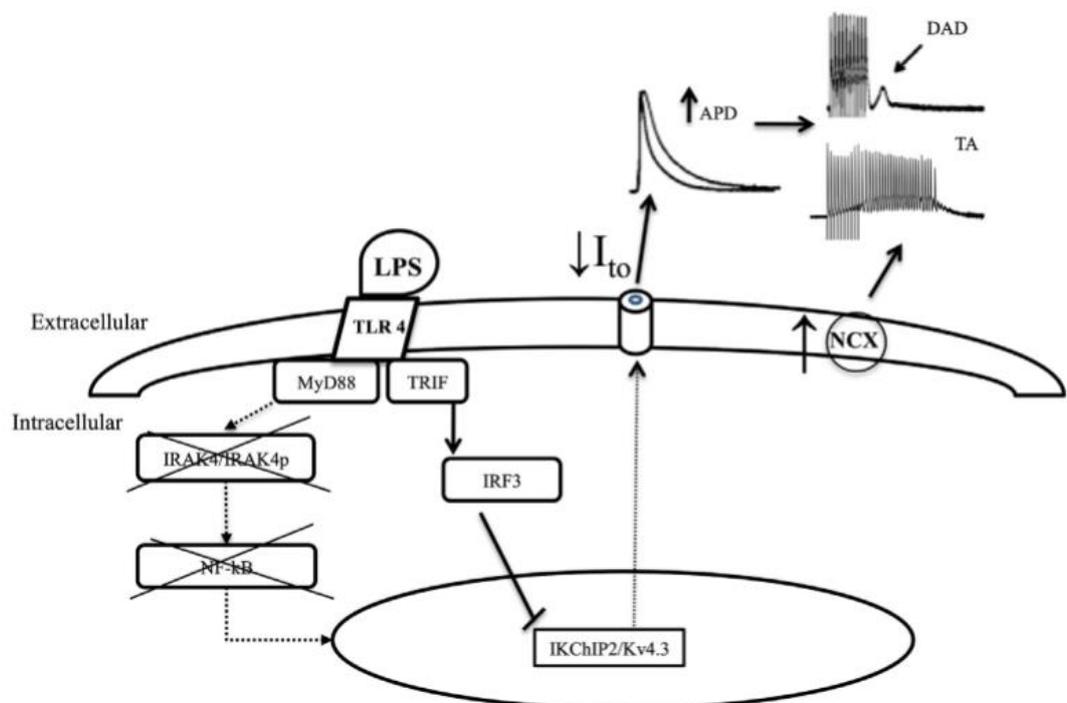


Figura 3- Mecanismos propostos mediante a ativação dos receptores TLR4

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

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

1.9 RESPOSTA SEXO ESPECIFICA NA IMUNIDADE INATA

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

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

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

1.10 DIMORFISMO SEXUAL E DIABETES

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

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

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

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

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

1.11 FUNÇÃO MITOCONDRIAL E DMI

As mitocôndrias estão presentes em todos os seres eucariontes. Desempenham importante papel na homeostase celular através de suas múltiplas funções, destacando dentre elas: A produção de energia (ATP), balanço redox e geração de ROS (Liu *et al.*, 2014).

A via metabólica mitocondrial denominada de fosforilação oxidativa consiste basicamente na produção de ATP. Para que ocorra esse fenômeno a mitocôndria realiza seu ciclo respiratório, que consiste no consumo de O₂ para transformação de CO₂ + H₂O, culminando na liberação de energia. Entretanto, por mais que a via de fosforilação oxidativa seja essencial para o metabolismo celular, produz ROS. Favorecendo o acúmulo de radicais livres acarretando no comprometimento de diversos componentes celulares (Dietl e Maack, 2017).

2. HIPOTESE DO TRABALHO

O DMI induz um remodelamento cardíaco dependente da ativação de TLR4 de maneira sexo específico.

3. OBJETIVO GERAL DO TRABALHO

Estudar o papel da ativação do TLR4 nas alterações elétricas e funcionais no DMI.

3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Testar a sub-hipótese que os animais espontaneamente diabéticos (NOD), também apresentam distúrbios cardíacos:

Realizar um estudo comparativo avaliando a função cardíaca entre animais NOD e NOR avaliando:

- 1 – Aspectos metabólicos e biométricos;
- 2 – Atividade elétrica e manejo de cálcio do coração através do registro de ECG, do Potencial de ação e do transiente de cálcio em coração inteiro;
- 3 – Avaliação da função ventricular esquerda por ecocardiografia;
- 4 – Avaliação da respiração mitocondrial.

Testar a sub-hipótese que o TLR4 modula a atividade elétrica cardíaca de maneira sexo-específico:

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

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

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

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

4.2 MODELO EXPERIMENTAL (Diabetes Mellitus do Tipo I)

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

Para a realização deste trabalho utilizamos também animais NOD. Esses animais desenvolvem espontaneamente DMI (Glicemia >250 mg/dL) a partir da

14^o semana após o nascimento. Optamos por trabalhar somente com fêmeas, pois apresentam maior susceptibilidade de desenvolverem DMI em relação aos machos. Considerados o padrão-ouro, já que recapitulam o processo natural da doença semelhante ao que acontece em humanos. De acordo com os criadores do modelo, os animais NOD começam a desenvolver DMI a partir da 14^o semana. Para esse presente estudo, utilizamos os animais após 4 semanas da detecção de hiperglicemia. Como controle experimental o Laboratório Jackson sugere a utilização de animais NOR, que são animais geneticamente modificados para criar uma resistência ao DMI.

4.3 MEDIDAS DE HIPERTROFIA CARDÍACA E UTERINA

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

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

4.4 CIRURGIA DE OVARIECTOMIA (OVX)

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

4.5 ELETROCARDIOGRAMA E TESTE DE VULNERABILIDADE A ARRITMIAS

Para a implantação de eletrodos subcutâneos, os animais foram previamente anestesiados com o anestésico isoflurano 1,5% em um fluxo de 1L/min de oxigênio. 24h após, foram realizados os registros de ECG na derivação DI durante 5 min com o animal acordado. No momento do registro, os conectores foram ligados por cabos flexíveis a um amplificador diferenciado (fabricado pelo professor Ariel Escobar, da Universidade da Califórnia, Merced), utilizando um filtro passa-baixa de 500 Hz e uma frequência de aquisição de 1 kHz. O sinal foi digitalizado utilizando o Digidata 1440A (Minidigi 1-D, Axon Instruments, EUA) e registrado pelo programa software Axoscope 9.0 (Axon Instruments, EUA). Foram analisados os parâmetros: RR, PR, Onda P, QRS e intervalo QJ. Optamos analisar o intervalo QJ, devido a que representa a despolarização precoce onde acontece a maior movimentação de cálcio nos cardiomiócitos de camundongos.

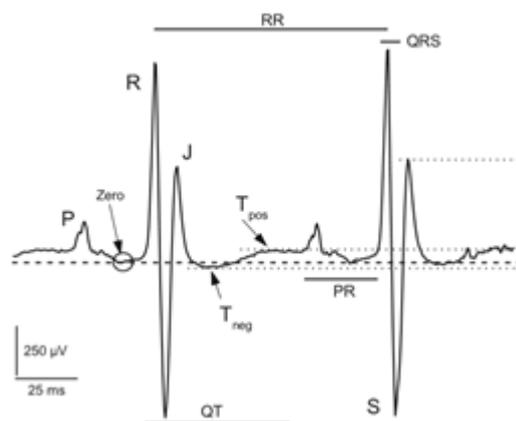


Figura 4 - Traçado representativo do eletrocardiograma em camundongo

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

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

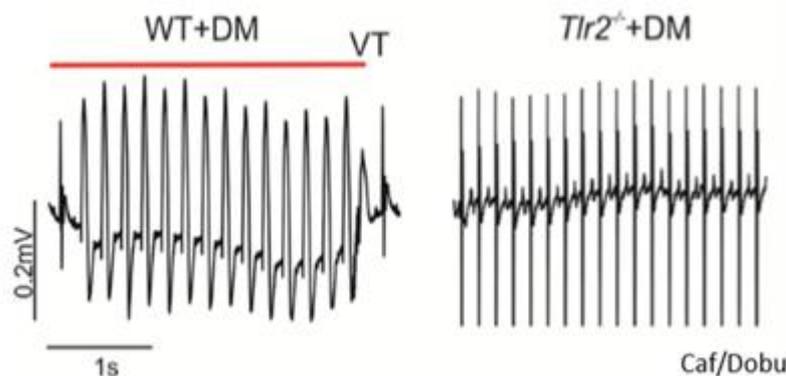


Figura 5 - Traçado representativo durante indução de arritmia utilizando Cafeína e Dobutamina. Traçado representativo durante o protocolo de arritmia através da administração de cafeína e dobutamina. A linha vermelha demonstra uma taquicardia ventricular. Na figura ao lado observa-se um traçado controle.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

4.6 – ECOCARDIOGRAMA

A função cardíaca foi avaliada por imageamento utilizando ressonância magnética nuclear ou ecocardiograma, de acordo com o modelo utilizado. Para a realização das duas técnicas, os animais foram anestesiados com 1,5% de isoflurano em um fluxo de 1L/min de oxigênio. No caso do ecocardiograma, os animais foram tricotomizados na região do precórdio e examinados com o equipamento Vevo 770 (Visual Sonics, Canadá) acoplado à um transdutor de 30 MHz. As imagens foram adquiridas no modo-M e analisadas pelo operador. Foram avaliadas fração de ejeção (F Ejeção), porcentagem de fração de encurtamento (FE) e volume sistólico e diastólico finais (VSF e VDF).

4.7 - ISOLAMENTO MITOCONDRIAL

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

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

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

As preparações de mitocôndrias isoladas obtidas foram submetidas a experimentos de respirometria de alta resolução (descrito em 4.18) a fim de verificar a qualidade da preparação obtida. A dosagem de proteína da preparação obtida foi realizada pelo método de Folin descrito por Lowri e

colaboradores (LOWRY et al., 1951) e posteriormente utilizada para análise da cinética enzimática da catalase mitocondrial.

4.8 - RESPIROMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO E MEDIDA DA PRODUÇÃO DE H₂O₂ POR FLUORESCENCIA

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

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

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

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

4.9 - PCR em tempo Real (qPCR)

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

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

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

4.10 - WESTERN BLOT

A partir das amostras de coração dos camundongos foi preparado o homogenato utilizando o TissueRupter (Qiagen, Alemanha) e o tampão de lise composto por: Sacarose 0,25 M, Imidazol 0,001 M, EDTA 0,001 M, Inibidor de tripsina em 0,15 mg/L pH:7,6. Em seguida, foi mensurada a concentração de proteína total pelo método de Bradford utilizando a curva standard de BSA. As amostras (25 µg de proteína total) foram colocadas no gel 10% de poliacrilamida composto por SDS 10%, acrilamida 40%, Bis-acrilamida 2% dissolvido em tampão Tris 3M pH:8,8 e água. corrida do gel foi realizada a 60 mA por 1 hora. Posteriormente foi realizada a transferência para membranas de PVDF a 350 mA por 1:30 h . Após bloqueio com leite em PBS (5% p/v) por 2h. As membranas foram incubadas overnight a 4°C com os respectivos anticorpos primários:Anti-oxphos (#ab110413): 1:1000 diluído em leite 1%/PBS. Anti-mouse (# ab6789): 1:5000 diluído em TBS-T 0,1%

4.11 - Análise Estatística

Para a análise estatística deste trabalho foi utilizado o programa GraphPadPrism 5.0. Todos os valores foram apresentados com média ± erro padrão da média (EPD). Foi utilizado o teste de normalidade de *kolmogorov-Smirnov*. Foram utilizados os testes t-student não pareado e One-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey para comparação entre todos os grupos. Para análise das arritmias foi utilizado o teste de Fisher. O valor $p < 0.05$ foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1 - ESTUDO DOS PARAMETROS BIOMÉTRICOS E METABÓLICOS NO MODELO NOD

Ao longo dos anos diferentes modelos animais foram propostos visando aprofundar os conhecimentos sobre o DMI. Nesse contexto, o Jackson Lab desenvolveu um modelo considerado como “padrão ouro” obtido através de modificações gênicas gerando uma fisiopatologia de DMI muito semelhante aos achados em humanos.

Os animais NOD apresentam hiperglicemia a partir da 14^o semana após seu nascimento. Estudos prévios de nosso grupo mostraram que 4 semanas de DMI é suficiente para os animais desenvolverem alterações cardiovasculares, pelo menos no modelo de DMI induzido por estreptozotocina utilizado já em nosso laboratório (Figura 6, a). Neste cenário, o presente desenho experimental consistiu em utilizar os animais NOD após 4 semanas a detecção de hiperglicemia (figura 6, b). O peso corporal foi mensurado ao final do protocolo experimental onde foi observado um ligeiro aumento do peso no grupo NOD quando comparado ao grupo NOR (Figura 6, c). Como parâmetro biométrico para avaliar o índice de hipertrofia cardíaca utilizou-se a razão peso do coração sobre o comprimento da tíbia. Os animais NOD apresentaram uma diminuição dessa razão, comparado ao seu controle experimental (Figura 6, d).

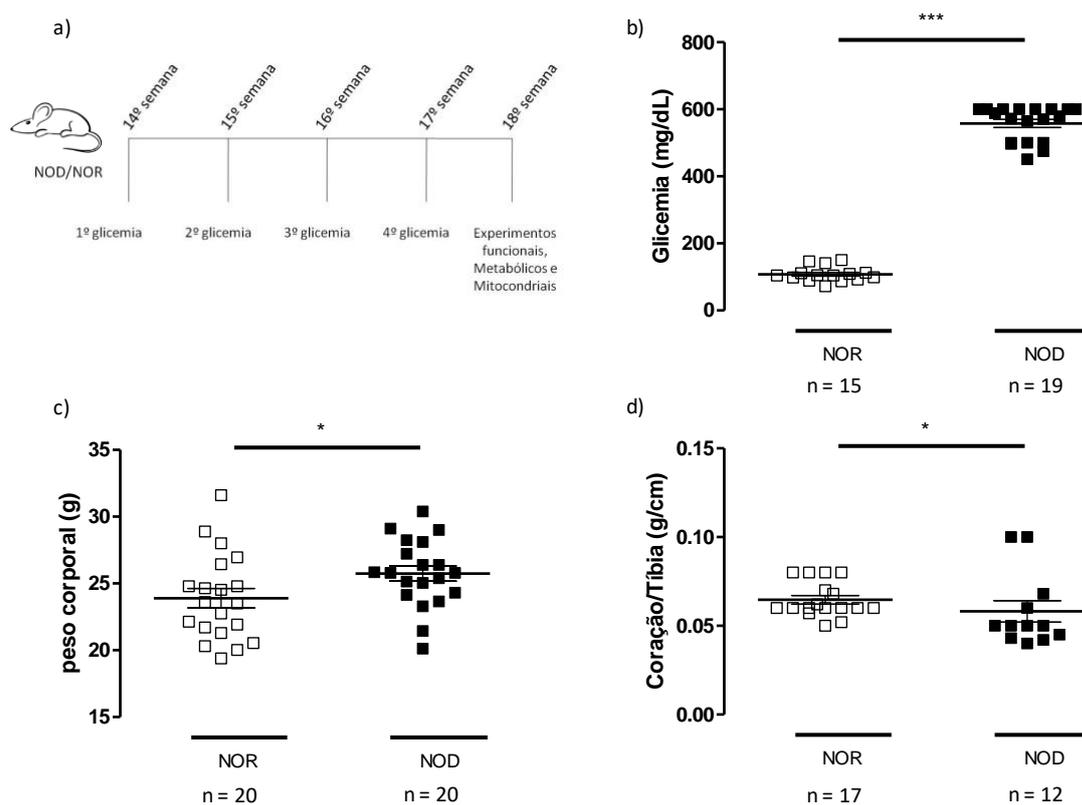


Figura 6 – Animais NOD apresentam alterações metabólicas e biométricas na 18^o semana

Linha curso-temporal experimental (a). Aumento da concentração de glicose no sangue (b). Peso corporal dos grupos experimentais (c). Índice de hipertrofia cardíaca (d). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. ** $p < 0,01$ vs WT CNTRL, *** $p < 0,0001$ vs NOR. NOR (n = 15 – 20) NOD (n = 12 – 20).

5.2 - AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ELÉTRICAS EM ANIMAIS NOD

Para investigar os efeitos da DMI na função elétrica cardíaca, foi realizado ECG *in vivo* nos grupos experimentais. A partir do traçado médio foram medidos os parâmetros eletrocardiográficos (Figura 7, a). Os animais NOD não apresentaram alteração na frequência cardíaca refletida pelos valores semelhantes no intervalo RR quando comparado aos animais NOR (Figura 7, b). Na condução átrio-ventricular observamos um aumento da duração nos animais NOD em relação ao seu próprio controle, esse aumento é observado através do prolongamento do intervalo PR (Figura 7, c). A duração da despolarização atrial é mensurada através da Onda P, nesse parâmetro os animais NOD apresentaram aumento na duração quando comparado aos animais NOR (Figura 7, d). No complexo QRS não foi observada diferença entre os grupos

experimentais (Figura 7, e). O grupo NOD apresentou um maior intervalo QJ quando comparado aos valores obtidos no grupo NOR, indicando possíveis alterações na repolarização ventricular (Figura 7, f).

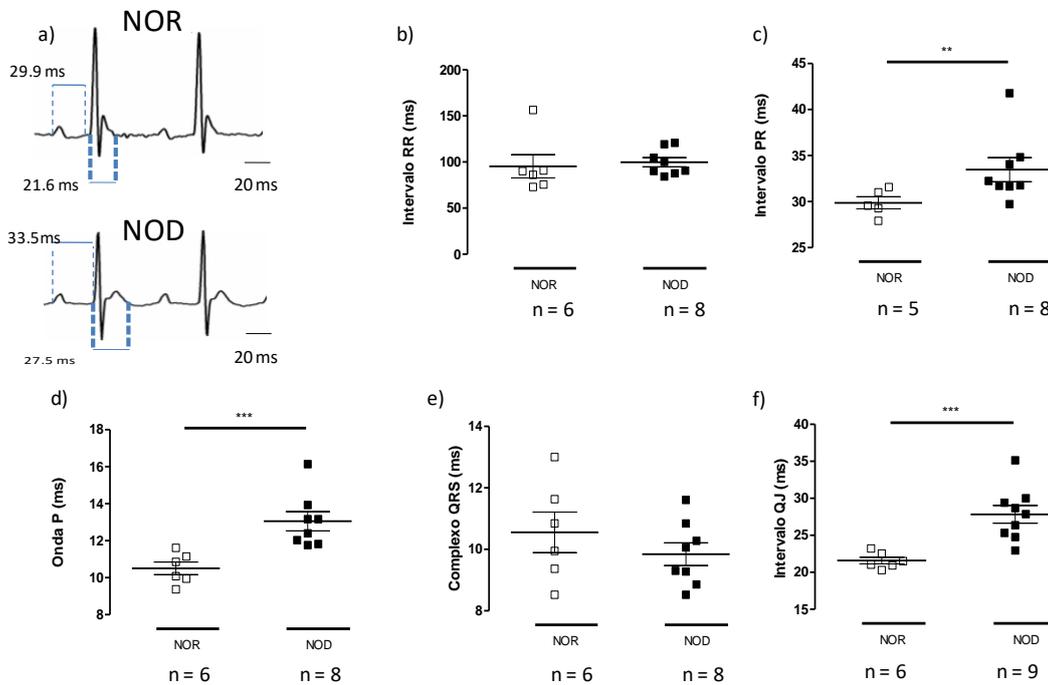


Figura 7 – O modelo NOD gera um remodelamento elétrico cardíaco

Os gráficos acima apresentam os parâmetros elétricos cardíacos: (a) frequência cardíaca, refletida através do intervalo RR. (b) Tempo de condução átrio-ventricular, intervalo PR. (c) Despolarização atrial, onda P. (d) Despolarização ventricular, Complexo QRS. (e) Intervalo QJ, avaliativo da função elétrica ventricular. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs NOR; ** $p < 0,001$ vs WT CNTRL; ** $p < 0,01$ vs WTD; *** $p < 0,01$ vs NOR. NOR (n = 5-6) NOD (n = 8-9).

5.3 - ESTUDO DO POTENCIAL ARRITMOGÊNICO EM ANIMAIS NOD

Para o estudo do potencial arritmogênico, camundongos dos dois grupos experimentais foram submetidos ao protocolo de estimulação com cafeína e dobutamina *in vivo*. Após 15 minutos de injetados (Caff/Dob.), foram avaliadas a severidade e susceptibilidade arritmogênica nesses animais. Os resultados demonstraram que os animais NOD apresentam maior vulnerabilidade a arritmias em relação ao grupo NOR (Figura 8, a-c).

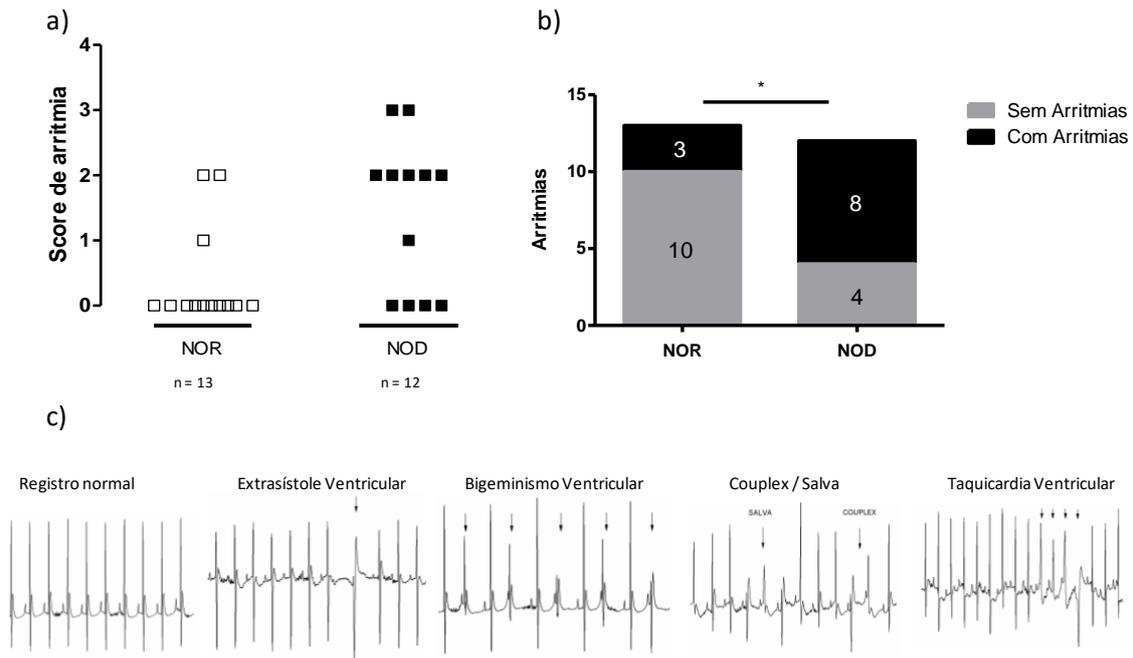


Figura 8 – Animais NOD apresentam maior vulnerabilidade a arritmias ventriculares

Score de arritmias dos 4 grupos experimentais. Os símbolos vazios simbolizam os controles e os símbolos cheios os grupos experimentais. 0 = ausência de eventos arritmicos durante o teste; 1 = contrações ventriculares prematuras; 2= presença de bigeminismo; 3 = taquicardia ventricular (VT) e 4 = fibrilação ventricular. Score de arritmias (a). Numero de eventos arritmogênicos nos dois grupos experimentais (b). Traçado representativo dos eventos encontrados durante o protocolo de indução de arritmias (c). NOR (n = 13) NOD (n = 12).

5.4 - ESTUDO DA FUNÇÃO VENTRICULAR EM ANIMAIS NOD

Para avaliar a função ventricular nos grupos experimentais utilizamos a técnica de ecocardiografia no CENABIO/UFRJ. Ao observamos o peso corrigido do ventrículo esquerdo podemos observar uma diminuição significativa dos animais NOD em relação aos NOR (a). Nos demais parâmetros analisados não tiveram diferenças nos grupos experimentais (Figura 9, a-f).

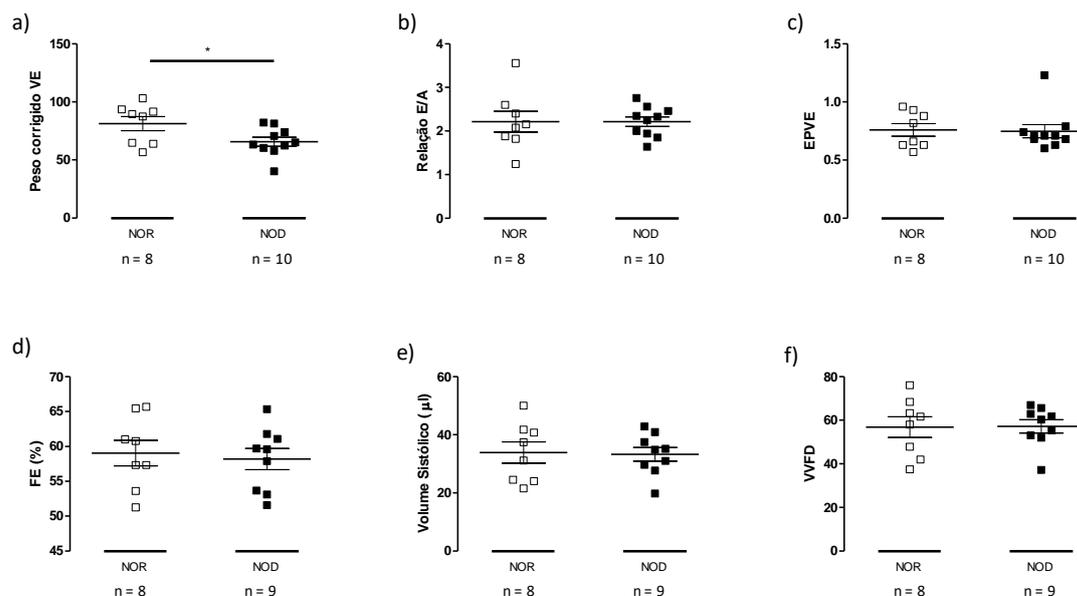


Figura 9 - O modelo NOD não gera alterações na função ventricular

Parâmetros ecocardiográficos analisados: a) Peso corrigido do VE, b) Relação E/A, c) Espessura da parede do VE, d) Fração de ejeção, e) Volume Sistólico e f) Volume ventricular ao final da diástole. VE – Ventrículo Esquerdo, E/A – Relação entre as ondas E e A, EPVE – Espessura da Parede do Ventrículo Esquerdo, FE – Fração de Ejeção, VVFD – Volume Ventricular ao Final da Diástole. NOR (n = 8) NOD (n = 9-10).

5.5 - ESTUDO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO E PRODUÇÃO DE H₂O₂

Uma das funções mitocondriais é gerar ATP. Para que ocorra esse fenômeno a mitocôndria realiza seu ciclo respiratório, que consiste no consumo de O₂ para transformação de CO₂ + H₂O, culminando na liberação de energia. Para avaliar o consumo de O₂ consumidos pela reação, utilizamos a técnica de respirometria de alta resolução.

A Figura 10 mostra que em geral não observamos diferenças no que diz respeito a respiração mitocôndria. Entretanto, as mitocôndrias cardíacas dos animais NOD mostraram um RCR maior do que as dos animais NOR (Figura 10, b). Além disso, foi observado um vazamento menor inespecífico de prótons (Protonleak) no grupo NOD (Figura 10, d).

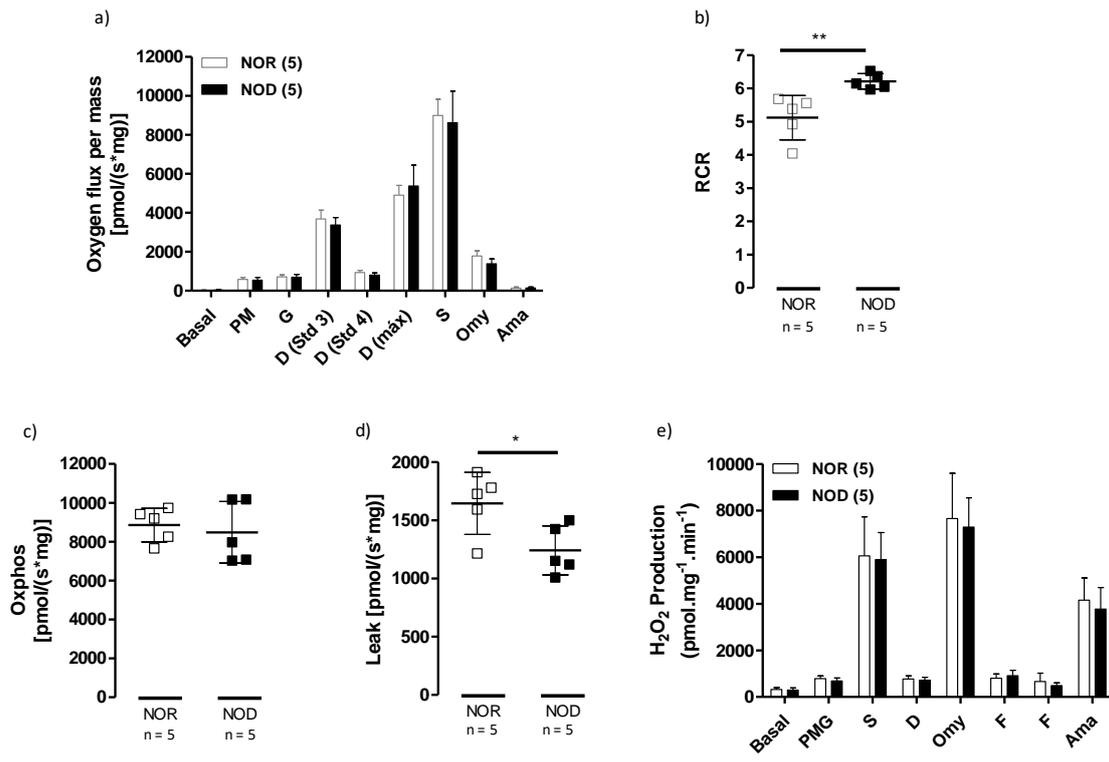


Figura 10 = Mitocôndrias cardíacas consomem mais O₂ no modelo NOD

(A) Perfil da respirometria de alta resolução com a utilização dos diferentes substratos do STE nos animais NOD e NOR. (B) Controle respiratório (Respiratory Control Ratio). (C) Fosforilação Oxidativa (Oxidate Phosphorylation). (D) Vazamento inespecífico de prótons (Protonleak). (E) Ensaio de produção de H₂O₂ com diferentes substratos do STE. NOR (n = 5) NOR (n = 5).

5.6 - ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTEICA DOS COMPLEXOS MITOCONDRIAIS EM CORAÇÃO DE ANIMAIS NOD

Na via metabólica da mitocôndria existem complexos capazes de gerar um transporte de elétrons. Esses complexos são didaticamente divididos e nomeados como a seguir: I,II, III, VI e V, sendo cada ponto representado por enzimas específicas da fosforilação oxidativa e do equilíbrio redox. Nesse sentido, fomos investigar a expressão protéica desses complexos nas mitocôndrias cardíacas. Assim, foi observado que apenas o complexo IV esta diminuído nos animais NOD em relação aos animais NOR (Figura 11, e). Em seu conjunto estes dados mostram que, pelo menos 4 semanas após terem começado a ficar diabéticos, a função das mitocôndrias isoladas do coração parecem estar funcionando normalmente, ou pelo menos quase normalmente.

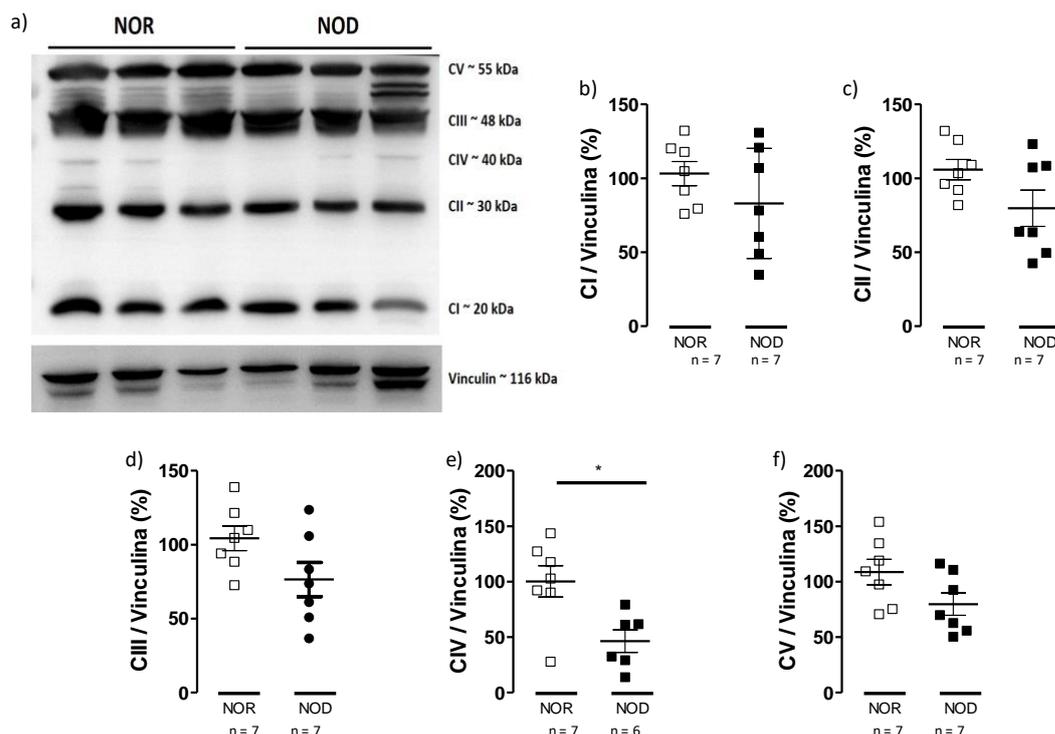


Figura 11 - O complexo IV mitocondrial está diminuído na fosforilação oxidativa em animais NOD

(A) Bandas protéicas dos cinco complexos mitocondriais nos grupos NOR e NOD. (B) NADH-coenzima Q oxidoreductase (CI). (C) Succinato-Q oxidoreductase (CII). (D) Q-citocromo C oxidoreductase (CIII). (E) Citocromo c oxidase (CIV). (F). NOR (n = 7) NOD (n = 6-7).

Os resultados até aqui mostrados, utilizando o modelo de DMI considerado padrão ouro, confirmam que esta doença é capaz de induzir alterações cardíacas. A fisiopatologia destas alterações, também já observadas em outro modelo de DMI por nosso grupo (Monnerat *et al.*, 2016), ainda não está totalmente esclarecida. Entretanto, nos últimos anos os avanços nos estudos do papel do sistema imune na fisiopatologia de diferentes distúrbios cardíacos abriram uma nova janela nesse caminho. Neste cenário, os próximos experimentos tentam entender se ativação do receptor TLR4, peça chave na via de síntese de IL-1 β , está envolvido na fisiopatologia das alterações cardíacas observadas no modelo murino de DMI induzido por estreptozotocina. Ainda, como é sabido existem diferenças na resposta metabólica entre os sexos, por isso, no presente estudo comparamos também os resultados obtidos entre fêmeas e machos.

5.7 – ANÁLISES BIOMÉTRICAS E METABÓLICAS EM ANIMAIS MACHOS

A hiperglicemia é característica principal encontrada em pacientes diabéticos. Para simular essa patologia, camundongos jovens de 8 semanas foram induzidos com 50mg/kg/dia de STZ durante 5 dias consecutivos. A STZ possui um efeito citotóxico para as células beta-pancreáticas levando a uma redução da massa celular e produção ineficaz de insulina. Esse processo resulta em aumento dos níveis plasmáticos de glicose. Como pode-se observar após 8 semanas de indução com STZ os camundongos machos apresentaram o aumento da glicemia quando comparados aos seus respectivos controles. Esse resultado valida o nosso modelo de estudo sobre DMI (Figura 12, a). Ao final do protocolo experimental os animais foram pesados e os 4 grupos experimentais não apresentaram diferenças estatísticas referentes a massa corporal (Figura 12, b). No que diz a hipertrofia cardíaca (Figura 12, c-d) foram utilizados duas relações amplamente utilizadas na literatura: peso coração/corporal e peso coração/comprimento da tíbia, ambas mostraram valores similares ente os grupos.

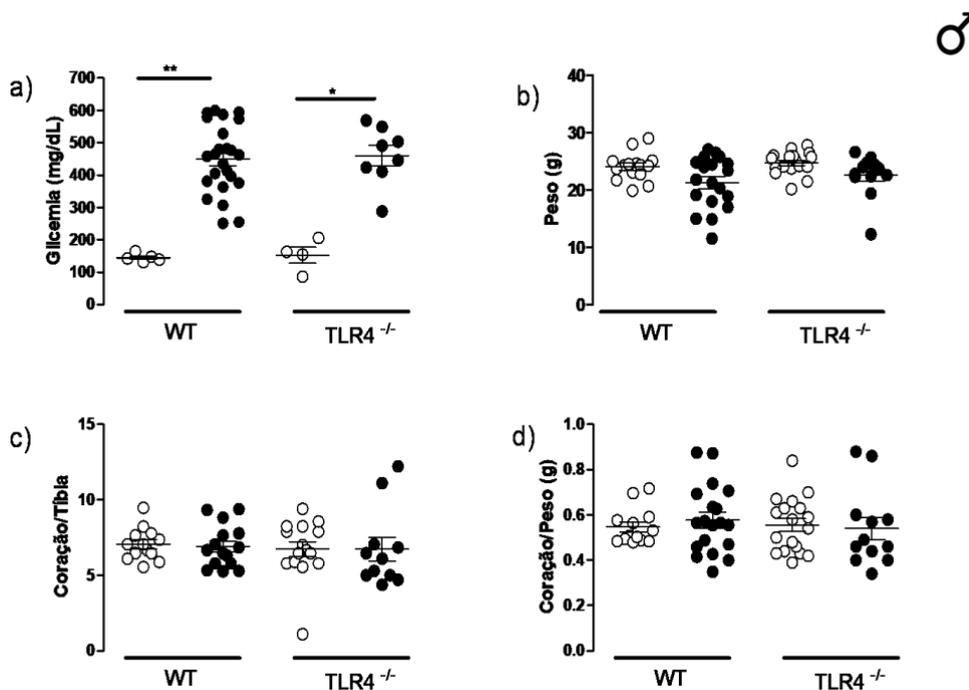


Figura 12 - O TLR4 não está envolvido nas alterações biométricas e metabólicas em camundongos machos

Glicemia mensurada na semana 8 nos grupos WT e *Tlr4*^{-/-} (a). Peso corporal dos grupos experimentais (b). Relação peso do coração/comprimento da tibia – índice de hipertrofia cardíaca (c). Relação peso do coração/peso corporal – índice de hipertrofia cardíaca (d). Valores expressos como média \pm erro padrão da média; * $p < 0,05$ *Tlr4* versus *TLR4* DM, ** $p < 0,01$ WT versus. WT (n = 5-15) WTDM (n = 15-24) *Tlr4*^{-/-} (n = 8-18) *Tlr4*^{-/-} DM (8-12).

5.8 – ANÁLISES BIOMÉTRICAS E METABÓLICAS EM ANIMAIS FÊMEAS

A fim de estabelecer a diferença entre os gêneros separamos os resultados em machos e fêmeas. Em machos observou-se que o TLR4 não participa das alterações metabólicas e biométricas. Deste modo, através do mesmo protocolo experimental fomos investigar os mesmo parâmetros nas fêmeas. Resultados demonstram que após 8 semanas de indução com STZ, camundongos fêmeas dos grupos experimentais utilizados, apresentaram aumento da glicemia quando comparados com seus respectivos controles, caracterizando o desenvolvimento de DMI (Figura 13, a). Não houve diferença significativa no peso corporal entre os grupos (Figura 13, b). Também não foi encontrada diferença significativa nos parâmetros utilizados para mensuração da hipertrofia cardíaca (Figura 13, c-d).

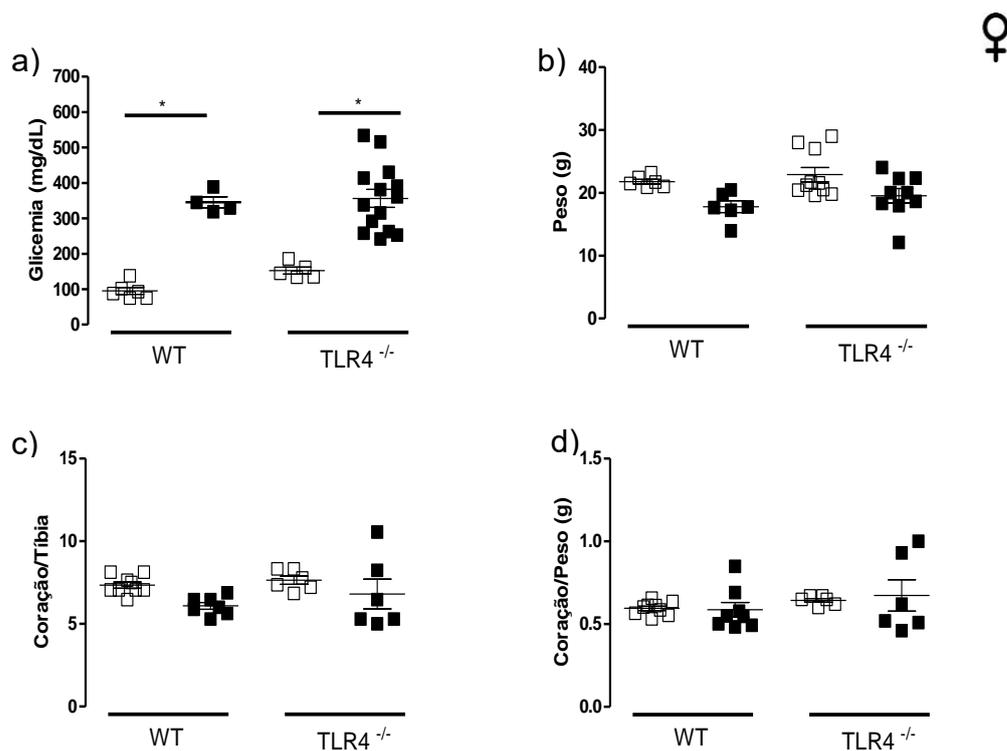


Figura 13 - O TLR4 não está envolvido nas alterações biométricas e metabólicas em camundongos fêmeas

Glicemia mensurada na semana 8 nos grupos WT e TLR4^{-/-} (a). Peso corporal dos grupos experimentais (b). Relação peso do coração/comprimento da tibia – índice de hipertrofia cardíaca (c). Relação peso do coração/peso corporal – índice de hipertrofia cardíaca (d). Valores expressos como média ± erro padrão da média; **p*<0,05 diabético *versus* seus respectivos CONTROLES. WT (n = 5-9) WTDM (n = 6-8) Tlr4^{-/-} (n = 6) Tlr4^{-/-} DM (n = 6-11).

5.9 – ANÁLISES ELÉTRCARDIOGRÁFICAS EM ANIMAIS MACHOS

Como descrito acima, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar qual o papel do TLR4 nas alterações eletrocardiográficas observadas no DMI em ambos os sexos. A Figura 11 mostra os parâmetros eletrocardiográficos obtidos *in vivo* em animais machos, WT e *knockout* para o gene TLR4. Os resultados indicam que houve alteração no intervalo RR no grupo TLR4^{-/-} DMI quando comparado aos resultados obtidos nos animais TLR4^{-/-} não diabéticos, mostrando um prolongamento do mesmo (Figura 11, a). Já os outros parâmetros analisados QRS, PR e onda P não mostraram diferenças entre os grupos TLR4^{-/-} (Figura 11). Estes mesmos dados quando analisados nos animais WT não mostraram diferenças.

Os trabalhos prévios de nosso grupo no modelo de DMI mostraram alterações na repolarização ventricular. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o DMI foi capaz de aumentar o intervalo QJ e que dito aumento não foi prevenido pela falta de TLR4 (Figura 11, e).

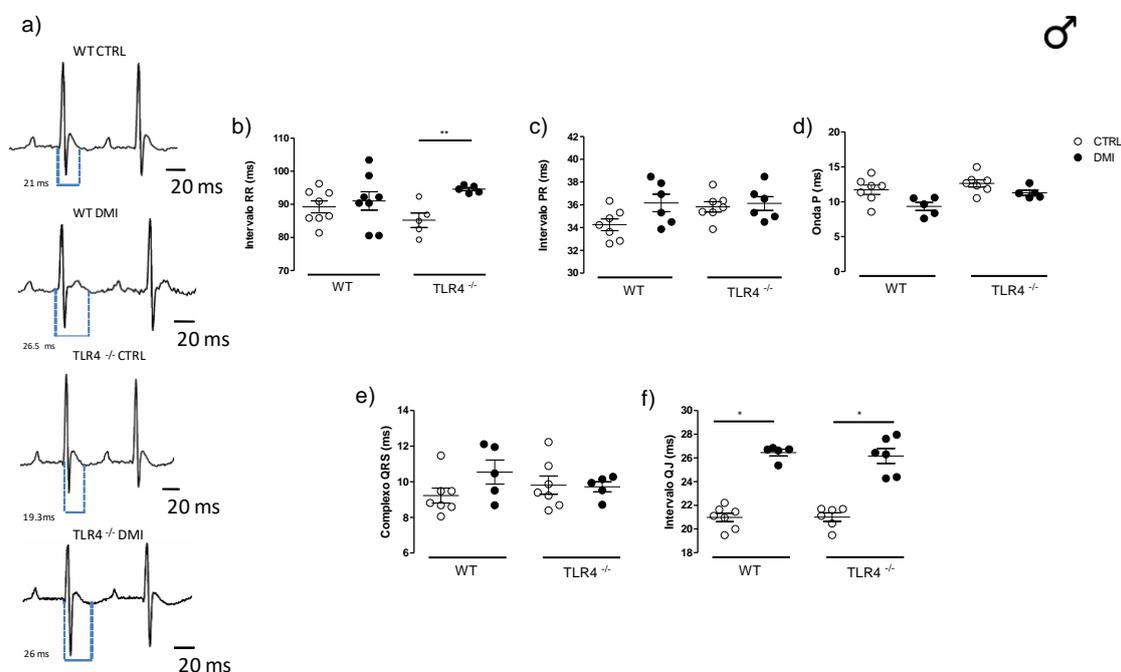


Figura 14 – A falta de TLR4 em camundongos machos não preveniu o aumento do intervalo QJ.

Parâmetros analisados do ECG na derivação D1 em camundongos machos. Traçados representativos dos 4 grupos experimentais e intervalo QJ (a). Frequência cardíaca, intervalo RR (b); condução átrio-ventricular, intervalo PR (c); despolarização atrial, onda P (d); despolarização ventricular, complexo QRS (e). Intervalo QJ (f). WT (n = 7-8) WTDM (n = 5-8) TLR4^{-/-} (n = 5-7) TLR4^{-/-} DM (n = 5-6).

5.10 – ANÁLISES ELETROCARDIOGRÁFICAS EM ANIMAIS FÊMEAS

Tendo avaliado os parâmetros elétricos em machos, fomos avaliar se o comportamento nas fêmeas era semelhante no que diz respeito ao remodelamento elétrico cardíaco. Os resultados demonstram que não ocorreu alteração na frequência cardíaca (Figura 15, b). Referente ao intervalo PR encontramos uma diferença significativa somente no grupo WT DMI quando comparado com WT não diabético (figura 15, c). Os dados mostram que não tiveram diferenças na onda P (Figura 15, d) e complexo QRS (Figura 15, e). Entretanto, ao analisarmos o parâmetro QJ do

eletrocardiograma observamos que nas fêmeas WT DMI esse intervalo encontra-se aumentado em relação ao seu próprio controle. Entretanto, as fêmeas TLR4^{-/-} DMI apresentaram um valor do intervalo QJ semelhante ao valor observado as fêmeas TLR4^{-/-} não diabéticas (figura 15, f).

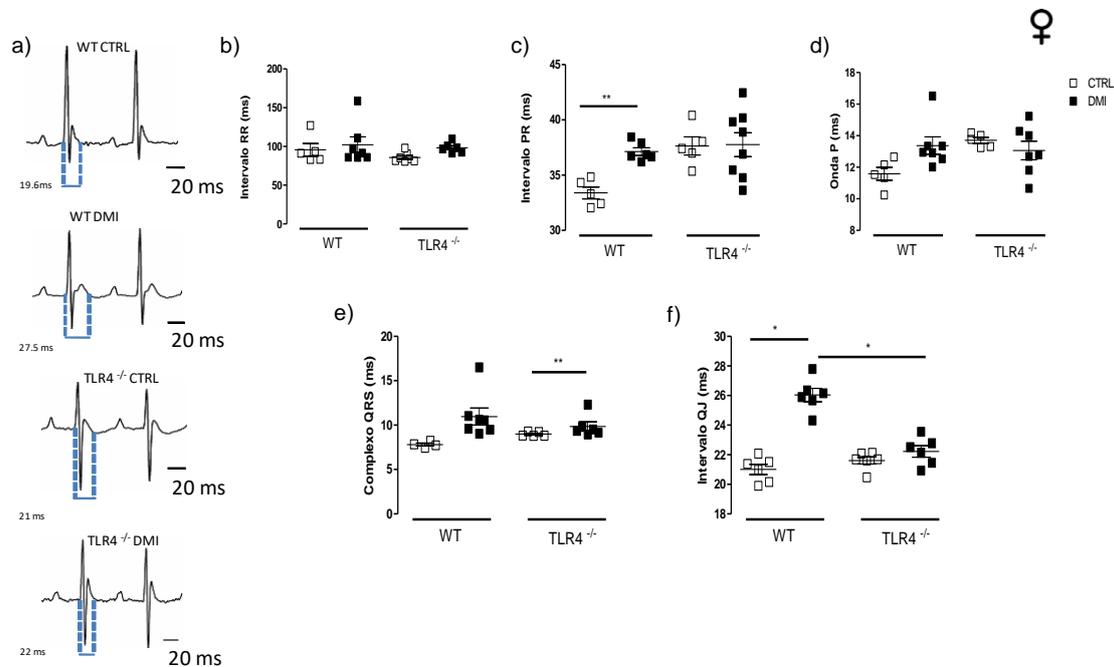


Figura 15 - Fêmeas TLR4^{-/-} previnem o aumento do intervalo QJ no modelo de DMI

Parâmetros analisados do ECG na derivação D1 em camundongos fêmeas. Traçado representativo dos 4 grupos experimentais, A linha azul indica o intervalo QJ (a). Frequência cardíaca, intervalo RR (b); condução átrio-ventricular, intervalo PR (c); despolarização atrial, onda P (d); despolarização ventricular, complexo QRS (e) e intervalo QJ em camundongos fêmeas (f). Valores expressos como média ± erro padrão da média; *p < 0,05 vs respectivos controles. WT CTRL (n=6), WT DM (n = 6), TLR4^{-/-} (n = 6) e TLR4^{-/-} DM (n = 6)

5.11 – ANÁLISE SEXO-ESPECÍFICO DO POTENCIAL ARRITMOGÊNICO

Analisando os parâmetros eletrocardiográficos podemos observar que a falta do receptor TLR4 não foi capaz de prevenir as alterações ocasionadas pelo DMI em camundongos machos. Entretanto, as fêmeas se mostraram protegidas no que diz respeito ao prolongamento do intervalo QJ, importante preditor de morte súbita.

Após termos observado um prolongamento no intervalo QJ, decidimos avaliar qual a vulnerabilidade e severidade de arritmias nos quatro grupos experimentais aqui

propostos em ambos os sexos. Para responder essa pergunta utilizamos um protocolo de indução de arritmias (Vide Métodos). Pode-se observar que as fêmeas WT DMI apresentaram maior número de eventos arrítmicos em comparação com seu respectivo controle não diabético. No entanto, as fêmeas TLR4^{-/-} DMI apresentaram eventos de severidades semelhantes TLR4^{-/-} não diabético e as fêmeas WT não diabéticas (Figura 16, a).

Os camundongos machos DMI apresentaram maior severidade nos eventos arritmogênicos em relação aos seus controles. Esse mesmo padrão se manteve quando utilizamos machos TLR4^{-/-} e induzimos a DMI. Não observando diferenças entre TLR4^{-/-} DMI e seu respectivo controle (Figura 16, b).

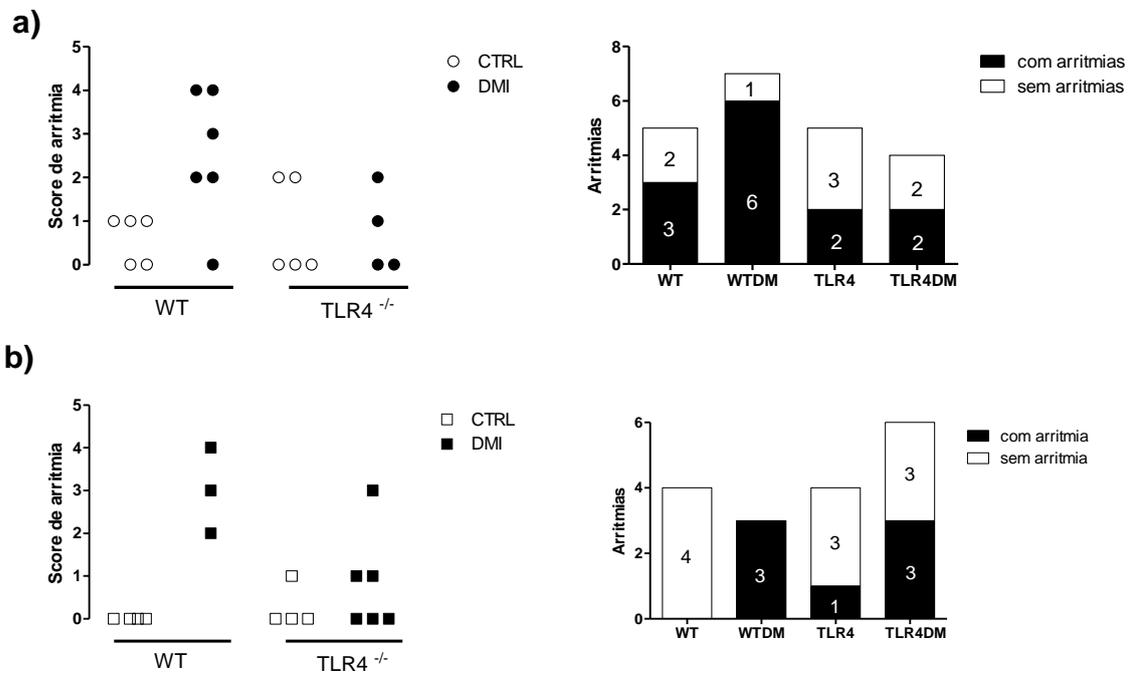


Figura 16 – A falta do receptor TLR4 preveniu a severidade de arritmias em ambos os gêneros. Na parte de cima da figura temos o painel experimental realizados em fêmeas (a). Na parte inferior temos o painel experimental realizados em machos (b). WT F (n = 5) WTDM F (n = 7) Tlr4^{-/-} F (n=5) Tlr4^{-/-} DM F (4). WT M (n = 4) WTDM M (n = 3) Tlr4^{-/-} M (n = 4) Tlr4^{-/-} DM M (n = 6)

5.12 – EXPRESSÃO GÊNICA DOS RECEPTORES TLR4 EM MACHOS E FÊMES

Os dados obtidos mostram diferença sexo específico nos valores de QJ e nas arritmias. Neste contexto, nos propusemos avaliar qual a expressão do TLR4 no ventrículo dos grupos experimentais aqui estudados.

Os resultados obtidos mostraram que em camundongos machos diabéticos ocorre um aumento da expressão gênica de TLR4 quando comparado com seu respectivo controle. Todavia, observa-se que as fêmeas TLR4^{-/-} DMI conseguem prevenir o aumento da expressão gênica de TLR4 quando comparada com seu respectivo controle e em relação aos camundongos machos. Estes dados sugerem que no modelo de DMI os machos expressam mais TLR4 no tecido cardíaco em relação as fêmeas (figura 17).

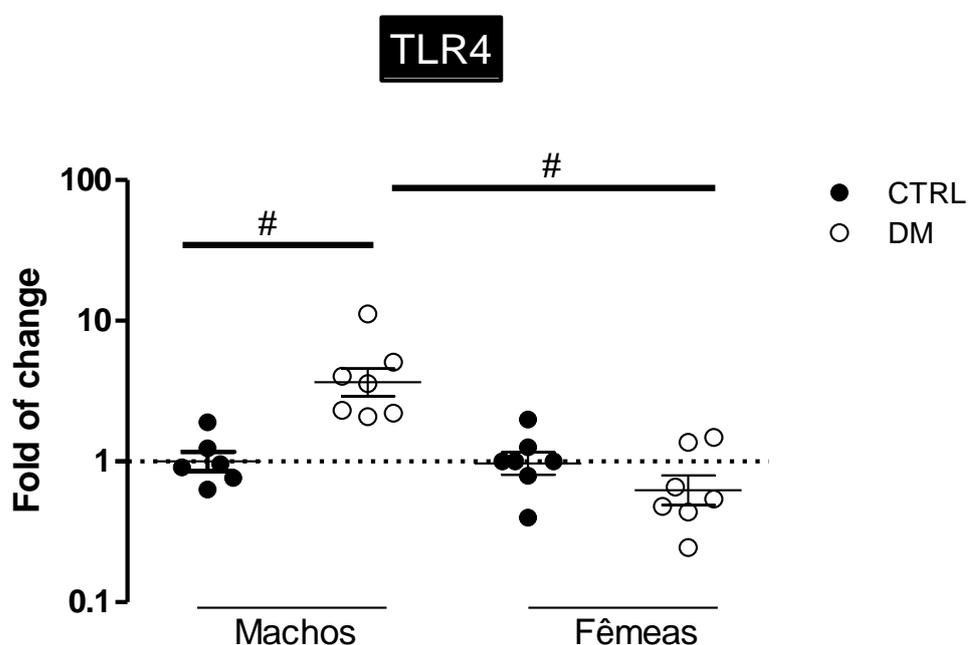


Figura 17 - Machos apresentam maior expressão de receptores TLR4 em comparação com fêmeas.

Expressão relativa do RNAm para o gene TLR4 comparativa entre machos e fêmeas. Os símbolos pretos são os controles e os símbolos brancos são os animais diabéticos. Valores expressos como média \pm erro padrão da média; # $p < 0,0001$ WT versus WTDM macho e WTDM macho versus TLR4^{-/-} DM fêmea. WT M (n = 6) WTDM M (n = 7) WT F (n = 7) WTDM F (n = 7).

5-13 – AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO NO CORAÇÃO

Os dados diferentes entre fêmeas e machos podem ser justificados, ou pelo menos ser sugerido, por diferenças na concentração de hormônios específicos como já descrito em outros modelos animais. Uma vez que o estrogênio é um dos principais hormônios femininos e sabe-se que o mesmo possui uma ação cardioprotetora no sistema cardiovascular (Menazza e Murphy, 2016) comparamos tanto a concentração desse hormônio e de seus receptores entre os grupos aqui propostos. Os resultados indicaram uma diminuição na expressão de RNAm nos grupos WT DMI, TLR4^{-/-} e TLR4^{-/-}DM quando comparados ao WT (Figura 18, a-b).

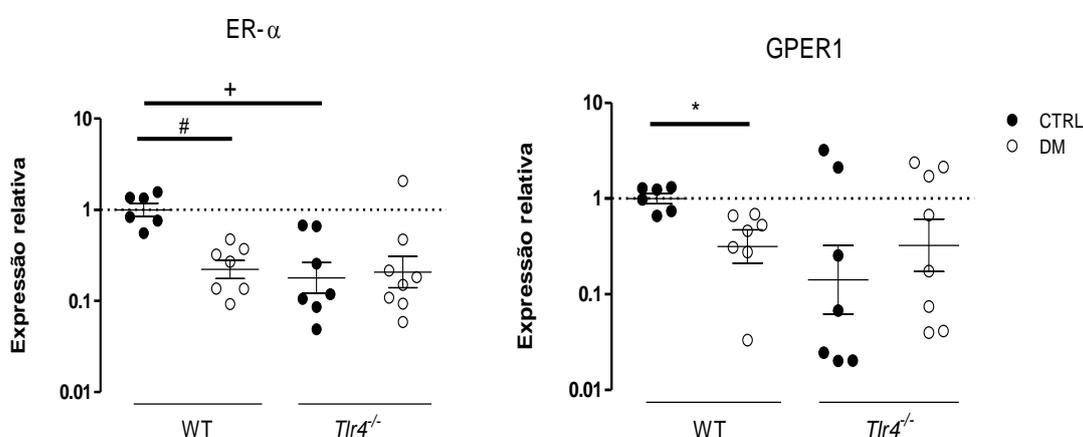


Figura 18 - Fêmeas TLR4^{-/-} apresentam uma redução da expressão dos receptores de estrogênio em corações.

Expressão gênica dos receptores de estrogênio alfa, ER-α (A) e receptores de estrogênio acoplados a proteína G, GPER1 (B) em corações de fêmeas. Valores expressos como média ± erro padrão da média; *p<0.05 WT versus seu próprio controle; # p<0.0001 WT versus seu próprio controle; + p<0.001 WT versus TLR4^{-/-}. WT (n = 6) WTDM (n = 7) Tlr4^{-/-} (n = 7) Tlr4^{-/-} DM (n = 8).

5.14 – ESTUDO DOS PARAMETROS BIOMÉTRICOS E METABÓLICOS EM ANIMAIS OVZ

Tendo em vista nossos resultados obtidos, nos perguntamos se o estrogênio poderia estar envolvido nos acometimentos eletrocardiográficos observados. Para testar isto comparamos os parâmetros eletrocardiográficos em animais ovariectomizados, visando evitar a influencia não só do estrogênio mas

também de todos os hormônios produzidos pelo ovário. Com isso, fomos avaliar primeiramente se a ovariectomia levaria a alguma alteração metabólica ou biométrica. Os resultados mostraram que houve aumento na glicemia dos grupos WT^{OVZ} DMI e TLR4^{-/-}OVZ DMI (figura 19, a). O peso corporal não foi alterado exceto quando comparamos TLR4^{-/-}OVZ versus TLR4^{-/-}OVZ DMI (Figura 19, b). Observou-se uma diminuição do peso uterino em todos os camundongos submetidos a OVX (Figura 19, c). Esses resultados indicam que nosso modelo de estudo foi bem sucedido.

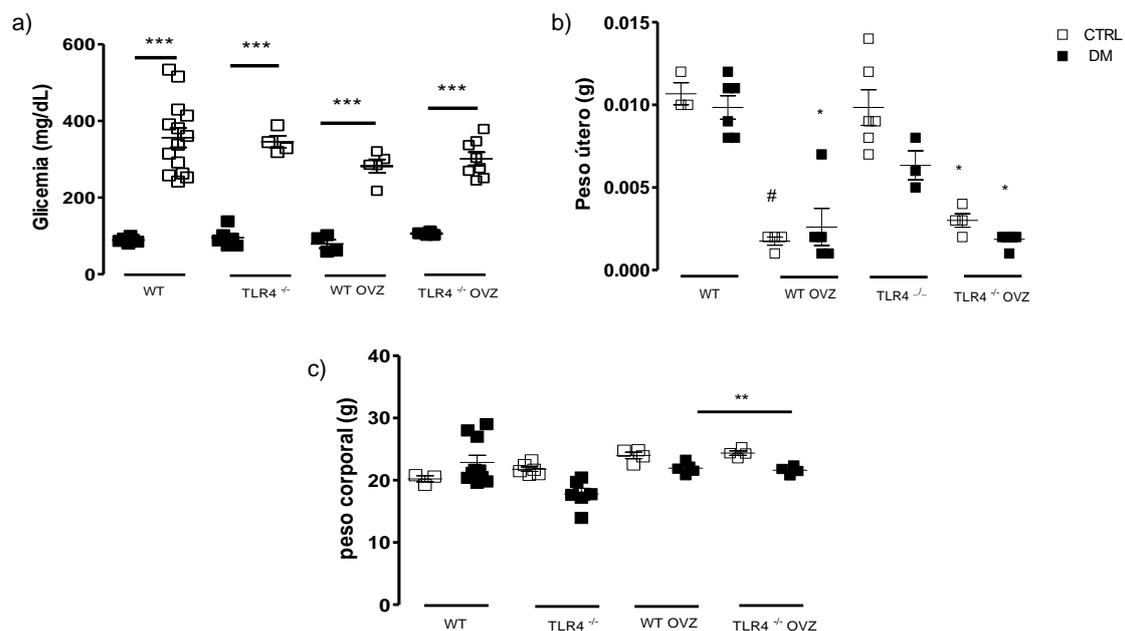


Figura 19 - Parâmetros biométricos e metabólicos em animais ovariectomizados

Análise da glicemia (a); peso corporal (b); peso do útero (c). Valores expressos como média \pm erro padrão da média; * p<0.05, tratado versus controle experimental; #p <0.001, ***p<0.0001 tratado versus seu controle experimental. WT (n = 4-6) WTDM (n = 6-14) TLR4^{-/-} (n = 4-8) TLR4^{-/-} DM (n = 4-8) WT^{OVZ} (n = 3-5) WT^{OVZ} DM (n = 5-9) TLR4^{-/-}OVZ (n = 4-8) TLR4^{-/-}OVZ DM (n = 4-8).

5.15 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ELETROCARDIOGRÁFICOS EM ANIMAIS OVZ

Já no que diz respeito aos parâmetros eletrocardiográficos nenhum dos grupos experimentais apresentaram alterações na frequência cardíaca (Figura 20, a). Os animais do grupo TLR4^{-/-}OVZ DMI apresentaram diminuição do intervalo PR comparado aos do grupo WT^{OVZ} DMI, indicando redução na duração do tempo de condução do nodo

átrio-ventricular (Figura 20, b). Não foram observadas diferenças significativas na onda P e no complexo QRS entre todos os grupos (Figura 20, c-d). Observou-se que a repolarização ventricular dos animais WT e WT^{OVX} induzidos a DMI aumentaram o intervalo QJ. Entretanto, a ausência do receptor TLR4 foi capaz de prevenir o aumento do intervalo QJ em animais TLR4^{-/-} OVX DMI. Esse resultado nos permite inferir que o estrogênio não estaria envolvido na cardioproteção observada em fêmeas TLR4^{-/-} (Figura 20, e).

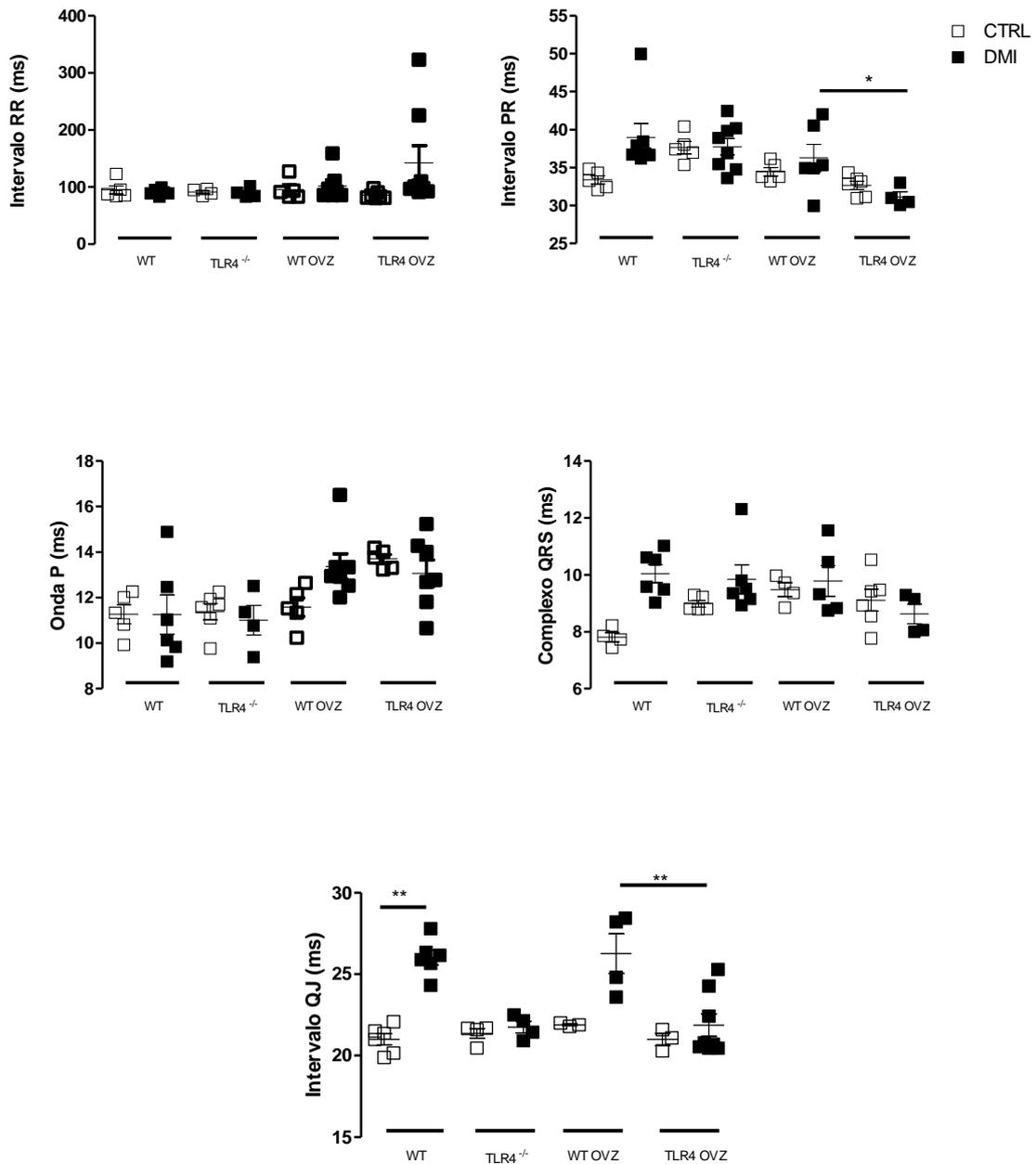


Figura 20 - Parâmetros elétricos dos camundongos ovariectomizados

Parâmetros analisados do ECG na derivação D1 em camundongos fêmeas. Frequência cardíaca, intervalo RR (a); condução átrio-ventricular, intervalo PR (b); despolarização atrial, onda P (c); despolarização ventricular, complexo QRS (d); repolarização ventricular, intervalo QJ (e). Valores expressos como média ± erro padrão da média; *p<0.05, tratado versus seu respectivo controle WT^{OVX} DM Vs. TLR4^{-/-}OVX DM ; **p < 0,001, tratado versus seu respectivo controle e WT^{OVX} DM versus TLR4^{-/-}OVX DM; ***p<0.001, tratado versus seu respectivo controle. WT (n = 4-6) WT DM (n = 6-7) TLR4^{-/-} (n = 4-5) TLR4^{-/-} DM (n = 4-8) WT^{OVZ} (n = 3-5) TLR4^{-/-}OVX (n = 3-6) TLR4^{-/-}OVX DM (n = 4-8).

6. Discussão

O DMI é um distúrbio metabólico que afeta diversos órgãos e sistemas. A longo prazo essa doença desencadeia alterações cardiovasculares.

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

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

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

Uma vez estudado os parâmetros biométricos e metabólicos do modelo, fomos investigar a atividade elétrica nesses camundongos através da técnica de eletrocardiograma *in vivo*. Nossos resultados demonstraram que os animais NOD apresentaram um aumento do intervalo PR. Esse prolongamento da condução atrioventricular pode ser caracterizado por um aumento da disfunção endotelial. Considerada uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em pacientes DMI, o comprometimento da função endotelial leva a uma rigidez arterial (Bertoluci, 2015). Neste sentido, um estudo de Crisel e colaboradores (2011) demonstraram uma correlação de pessoas com doenças coronarianas instáveis com o aumento de bloqueios atrioventriculares (Crisel *et al.*, 2011).

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

O intervalo QJ do eletrocardiograma em camundongos reflete a repolarização precoce ventricular (López Alarcón *et al.*, 2019). Gussak e colaboradores (2000) demonstraram que um aumento nesse intervalo estaria associado a uma diminuição da densidade da corrente I_{to} . Nossos dados demonstraram que os animais NOD, apresentaram esse aumento de QJ. Essa alteração poderia ocasionar uma maior predisposição a eventos arrítmicos tal como estaria relacionada com a morte súbita em pacientes DMI (Kahn, Sisson e Vinik, 1987).

Sabe-se que as arritmias atriais como a fibrilação atrial são as arritmias mais comuns em pacientes diabéticos, porém não são tão severas quanto as arritmias ventriculares. Por esse motivo optamos somente por analisar as arritmias ventriculares. Através do protocolo amplamente utilizado de caff/dob fomos avaliar a vulnerabilidade de arritmias nesses animais. Foi observado que os animais NOD apresentaram maior severidade nos eventos quando comparados a seu próprio controle, NOR. Já, ao fazermos uma análise comparativa com os animais induzidos por STZ observamos uma maior susceptibilidade em relação aos NOD. Em parte, a predisposição as arritmias ventriculares podem estar associadas a neuropatia autonômica diabética (NAD). De modo que ocorra uma diminuição do tônus parassimpático aumentando a atividade simpática, favorecendo o surgimento de arritmias (Weston and Gill, 1999). Essa hipótese ainda pode ser mais fortemente embasada através da correlação entre intervalo QT e NAD, segundo Bellavere e colaboradores (1988). Apesar de nossos resultados terem demonstrado aumento do QJ em camundongos e alguns animais apresentarem arritmias ventriculares, o tempo de diabetes pode não ter sido o suficiente para reproduzir tais alterações em nível neurológico. Para avaliar melhor a predisposição a arritmias serão necessário experimentos mais complexos com intuito de avaliar a disponibilidade intracelular do Ca^{2+} , bem como a estimulação elétrica desses corações.

No estudo da função ventricular não encontramos nenhuma alteração nos parâmetros analisados em 18 semanas de DMI. Corroborando com nossos achados, Di Core. A e colaboradores (2007) demonstraram que em humanos a função ventricular através da técnica convencional de ecocardiografia estava preservada quando o mesmo comparou com o grupo controle. Por outro lado, o mesmo autor levanta a questão que a técnica mais moderna e mais sensível de ecocardiografia, o Doppler é capaz de detectar alterações na função sistólica do ventrículo esquerdo. Adicionalmente ao questionamento da técnica aplicada, algumas correntes suportam a ideia de que as alterações do VE estão associadas a pacientes com idades mais avançadas e em pacientes com maior tempo de DMI associadas a uma maior predisposição a desenvolver retinopatia e microalbuminúria. (Mor-Avi V, e col (2011), (Geyer H, e col (2010). Como conclusão do estudo da função ventricular podemos propor que: 1) O nosso ponto de corte em 18 semanas pode não ter sido suficiente para que os camundongos apresentem disfunção ventricular. 2) O método aplicado neste estudo não foi sensível suficiente para capturar essas alterações.

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

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

Na progressão do DM um dos agravantes observados é a cardiomiopatia diabética. Durante o desenvolvimento da CD observam-se fibroses, hipertrofia e disfunção contrátil, fatores que levam a um aumento da massa cardíaca. Esses fatores

resultam no comprometimento da função mecânica, favorecendo um maior risco de mortalidade (Avila *et al.*, 2014). Nossos dados demonstram que os índices hipertróficos cardíacos não foram alterados em ambos os sexos. Contudo, um estudo de (Li *et al.*, 2011). demonstrou, que após a indução de DM, os parâmetros como: peso do coração e peso corporal, não sofreu alterações, corroborando com os nossos resultados.

Nosso grupo demonstrou que a liberação de citocinas pró-inflamatórias favorece o aumento dos intervalos QT e QTc, assim como vulnerabilidade a arritmias cardíacas (Monnerat *et al.*, 2016). De acordo com Monnerat-Cahli *et al.*, 2014, a ativação do receptor TLR4 aumentara duração de repolarização ventricular em células cardíacas, fator que pré-dispõe ao surgimento de arritmias. Curiosamente, Alárcon. M. M, 2017(Alarcón, 2017) através de experimentos *in vivo* demonstrou que o aumento do intervalo QT e QTc em animais TLR4^{-/-} DMI, ocorre de maneira gênero-dependente. Resultado esse que podemos observar também em nossos animais.

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

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

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

18 e TNF α no miocárdio (Calippe *et al.*, 2010). Entretanto, através da DM ocorre uma diminuição da sua expressão. Portanto, esses resultados inferem que a DM, assim como falta de TLR4 poderia estar envolvida com uma menor expressão dos receptores de estrogênio no coração.

Para avaliar ação do estrogênio sobre a atividade elétrica cardíaca, animais OVX foram utilizados nesse estudo. Através de injeções intraperitoneais de STZ, observou-se que a falta do estrogênio não alterou os níveis altos de glicose. Com a ovariectomia bilateral observou-se uma redução do peso uterino. Essa redução pode ser estabelecida por uma diminuição da espessura do epitélio e do número de glândulas uterinas. (Aulock *et al.*, 2006).

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

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

7. Conclusão

O modelo de DMI nos animais NOD recapitulou os acometimentos metabólicos e biométricos clássicos da doença;

Os animais NOD desenvolveram alterações eletrocardiográficas tipicamente achadas em outros modelos de DMI e em pacientes;

TLR4 está envolvido no prolongamento do intervalo QJ em ambos os sexos;

O estrogênio não está envolvido na prevenção do prolongamento do intervalo QJ induzido pelo TLR4.

8. Referências Bibliográficas

Adeghate, E. *et al.* (2010) "Medicinal Chemistry of Drugs Used in Diabetic Cardiomyopathy", *Current*

Medicinal Chemistry, 17(6), p. 517–551. doi: 10.2174/092986710790416281.

Alarcón, M. L. ope. (2017) *Maria Micaela López Alarcón Impacto da ativação do sistema imune inato na função elétrica e mecânica cardíaca.*

Anand, S. S. *et al.* (2008) “Risk factors for myocardial infarction in women and men: Insights from the INTERHEART study”, *European Heart Journal*, 29(7), p. 932–940. doi: 10.1093/eurheartj/ehn018.

Aulock, S. Von *et al.* (2006) “Gender Difference in Cytokine Secretion on Immune Stimulation with LPS and LTA”, *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 26(12), p. 887–892. doi: 10.1089/jir.2006.26.887.

Avila, G. *et al.* (2014) “Functional and structural impact of pirfenidone on the alterations of cardiac disease and diabetes mellitus”, *Cell Calcium*, 56(5), p. 428–435. doi: 10.1016/j.ceca.2014.07.008.

Beagley, K. W. e Gockel, C. M. (2003) “Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone”, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 38(1), p. 13–22. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00202-5.

Bellavere, F. *et al.* (1988) “Prolonged QT period in diabetic autonomic neuropathy: A possible role in sudden cardiac death?”, *Heart*, 59(3), p. 379–383. doi: 10.1136/hrt.59.3.379.

Bertoluci, M. C. (2015) “Endothelial dysfunction as a predictor of cardiovascular disease in type 1 diabetes”, *World Journal of Diabetes*, 6(5), p. 679. doi: 10.4239/wjd.v6.i5.679.

Bluestone, J. A. *et al.* (2016) “diabetes”, 464(7293), p. 1293–1300.

Cai, W. *et al.* (2011) “Epigenetic Regulation of Glucose Transporter 4 by Estrogen Receptor β ”, *Molecular Endocrinology*, 25(12), p. 2017–2028. doi: 10.1210/me.2011-1054.

Calippe, B. *et al.* (2010) “17 -Estradiol Promotes TLR4-Triggered Proinflammatory Mediator Production through Direct Estrogen Receptor Signaling in Macrophages In Vivo”, *The Journal of Immunology*, 185(2), p. 1169–1176. doi: 10.4049/jimmunol.0902383.

Chuang, S. M. *et al.* (2013) “Protective effects of estrogen on ischemia/reperfusion-induced bladder dysfunction in female rabbits”, *Menopause*, 20(2), p. 209–217. doi: 10.1097/gme.0b013e3182635bae.

Crisel, R. K. *et al.* (2011) “First-degree atrioventricular block is associated with heart failure and death in persons with stable coronary artery disease: Data from the Heart and Soul Study”, *European Heart Journal*, 32(15), p. 1875–1880. doi: 10.1093/eurheartj/ehr139.

Dasu, M. R. M. R. *et al.* (2008) “High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes”, *Diabetes*, 57(11), p. 3090. doi: 10.2337/db08-0564.

Dietl, A. e Maack, C. (2017) “Targeting Mitochondrial Calcium Handling and Reactive Oxygen Species in

Heart Failure”, *Current Heart Failure Reports*. *Current Heart Failure Reports*, 14(4), p. 338–349. doi: 10.1007/s11897-017-0347-7.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Jin, K. K. *et al.* (2006) “Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms”, *Journal of Biological Chemistry*, 281(10), p.

6760–6767. doi: 10.1074/jbc.M511024200.

Kahn, J. K., Sisson, J. C. e Vinik, A. I. (1987) “QT interval prolongation and sudden cardiac death in diabetic autonomic neuropathy”, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 64(4), p. 751–754. doi: 10.1210/jcem-64-4-751.

Katsarou, A. *et al.* (2017) “Type 1 diabetes mellitus”, *Nature Reviews Disease Primers*. Macmillan Publishers Limited, 3, p. 1–18. doi: 10.1038/nrdp.2017.16.

Kawada, H. *et al.* (2006) “Tumor necrosis factor-alpha downregulates the voltage gated outward K+ current in cultured neonatal rat cardiomyocytes: a possible cause of electrical remodeling in diseased hearts.”, *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 70(5), p. 605–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16636498>.

Klein, S. L. e Flanagan, K. L. (2016) “Sex differences in immune responses”, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 16(10), p. 626–638. doi: 10.1038/nri.2016.90.

Lee, S. J. *et al.* (2001) “Effect of estrogen on endothelial dysfunction in postmenopausal women with diabetes”, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 54, p. S81–S92. doi: 10.1016/S0168-8227(01)00339-4.

Leon, B. M. (2015) “Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research”, *World Journal of Diabetes*, 6(13), p. 1246. doi: 10.4239/wjd.v6.i13.1246.

Li, Y. *et al.* (2011) “Targeted inhibition of calpain reduces myocardial hypertrophy and fibrosis in mouse models of type 1 diabetes”, *Diabetes*, 60(11), p. 2985–2994. doi: 10.2337/db10-1333.

Libby, P., Ridker, P. M. e Hansson, G. K. (2009) “Inflammation in Atherosclerosis From Pathophysiology to Practice”, *Journal of the American College of Cardiology*, 54(23), p. 2129–2138. doi: 10.1016/j.jacc.2009.09.009.Inflammation.

Liu, H. *et al.* (2014) “Mitochondrial p38 β and manganese superoxide dismutase interaction mediated by estrogen in cardiomyocytes”, *PLoS ONE*, 9(1). doi: 10.1371/journal.pone.0085272.

Liu, X. J. *et al.* (2016) “TLR signaling adaptor protein MyD88 in primary sensory neurons contributes to persistent inflammatory and neuropathic pain and neuroinflammation”, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(March), p. 1–11. doi: 10.1038/srep28188.

López Alarcón, M. M. *et al.* (2019) “Phase 1 repolarization rate defines Ca²⁺ dynamics and contractility on intact mouse hearts”, *The Journal of general physiology*, 151(6), p. 771–785. doi: 10.1085/jgp.201812269.

Malta, D. C. *et al.* (2014) “Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões, 2000 a 2011”, *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 23(4), p. 599–608. doi: 10.5123/S1679-49742014000400002.

- Melchjorsen, J. *et al.* (2005) "Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner", *Journal of virology*, 79(20), p. 12944. doi: 10.1128/JVI.79.20.12944.
- Menazza, S. e Murphy, E. (2016) "The expanding complexity of estrogen receptor signaling in the cardiovascular system", *Circulation Research*, 118(6), p. 994–1007. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.305376.
- Monnerat-Cahli, G. *et al.* (2014) "Toll-like receptor 4 activation promotes cardiac arrhythmias by decreasing the transient outward potassium current (I_{to}) through an IRF3-dependent and MyD88-independent pathway", *Journal of molecular and cellular cardiology*. Elsevier Ltd, 76, p. 116–125. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.08.012.
- Monnerat, G. *et al.* (2016) "Macrophage-dependent IL-1 β production induces cardiac arrhythmias in diabetic mice", *Nature Communications*, 7. doi: 10.1038/ncomms13344.
- Mosca, L., Barrett-Connor, E. e Kass Wenger, N. (2011) "Sex/gender differences in cardiovascular disease prevention: What a difference a decade makes", *Circulation*, 124(19), p. 2145–2154. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.968792.
- Nativel, B. *et al.* (2013) "Soluble HMGB1 Is a Novel Adipokine Stimulating IL-6 Secretion through RAGE Receptor in SW872 Preadipocyte Cell Line: Contribution to Chronic Inflammation in Fat Tissue", *PLoS ONE*, 8(9), p. 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0076039.
- Niemeijer, M. N. *et al.* (2015) "Pharmacogenetics of Drug-Induced QT Interval Prolongation: An Update", *Drug Safety*. Springer International Publishing, 38(10), p. 855–867. doi: 10.1007/s40264-015-0316-6.
- Odening, K. E. *et al.* (2012) "Estradiol promotes sudden cardiac death in transgenic long QT type 2 rabbits while progesterone is protective", *Heart Rhythm*. Elsevier Inc., 9(5), p. 823–832. doi: 10.1016/j.hrthm.2012.01.009.
- Panama, B. K. *et al.* (2011) "Nuclear factor kb downregulates the transient outward potassium current I_{to,f} through control of KChIP2 expression", *Circulation Research*, 108(5), p. 537–543. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.229112.
- Patterson, C. C. *et al.* (2003) "Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes", *Diabetologia*, 46(6), p. 760–765. doi: 10.1007/s00125-003-1116-6.
- Peters, S. A. E. *et al.* (2015) "Sex Differences in the Excess Risk of Cardiovascular Diseases Associated with Type 2 Diabetes: Potential Explanations and Clinical Implications", *Current Cardiovascular Risk Reports*, 9(7), p. 1–7. doi: 10.1007/s12170-015-0462-5.
- Rana, B. S. *et al.* (2005) "QT interval abnormalities are often present at diagnosis in diabetes and are better

predictors of cardiac death than ankle brachial pressure index and autonomic function tests”, *Heart*, 91(1), p. 44–50. doi: 10.1136/hrt.2003.017632.

Regensteiner, J. G. *et al.* (2015) “Sex differences in the cardiovascular consequences of diabetes mellitus a scientific statement from the American Heart Association”, *Circulation*, 132(25), p. 2424–2447. doi: 10.1161/CIR.0000000000000343.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WALLEY, K. *et al.* (2006) “Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and

initiates an NF- κ B dependent inflammatory response ☆”, *Cardiovascular Research*, 72(3), p. 384–393. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.09.011.

Zha, Q. B. *et al.* (2016) “ATP-induced inflammasome activation and pyroptosis is regulated by AMP-activated protein kinase in macrophages”, *Frontiers in Immunology*, 7(DEC), p. 1–16. doi: 10.3389/fimmu.2016.00597.