

**Bruno Durante da Silva**

**Estudo do efeito cardioprotetor da Empagliflozina no infarto agudo do miocárdio em ratos *Wistar* com diabetes induzida por estreptozotocina**

São Paulo

2023

**Bruno Durante da Silva**

**Estudo do efeito cardioprotetor da Empagliflozina no infarto agudo do miocárdio em ratos *Wistar* com diabetes induzida por estreptozotocina**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em ciências

Programa de Cardiologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen

São Paulo

2023

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Bruno Durante  
Estudo do efeito cardioprotetor da  
Empagliflozina no infarto agudo do miocárdio em  
ratos Wistar com diabetes induzida por  
estreptozotocina  
/ Bruno Durante Silva. -- São Paulo, 2023.  
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Cardiologia.  
Orientadora: Maria Cláudia Costa Irigoyen.

Descritores: 1.Ratos Wistar 2.Diabetes mellitus  
3.Infarto do miocárdio 4.Empagliflozina  
5.Ecocardiografia 6.Colágeno 7.Estresse oxidativo

USP/FM/DBD-428/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus grandes amores, os meus nonos Andrea (in memorian) e Angiolina, por todo amor, carinho e anos de doação imensuráveis.

Aos meus pais Gildo e Elisa, por todo amor, suporte e por serem meu porto seguro de sempre e para sempre.

As minhas tias Fabia e Assunta, por todo amor e apoio.

Sem vocês, tenho a plena convicção que este momento jamais teria chegado.

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, a Deus, por ter me concedido coragem e determinação nessa longa caminhada, mas principalmente pela força e resiliência para seguir, mesmo após as mais duras quedas.

A minha amada amiga, psicóloga, orientadora e “mãe” científica, Profa. Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen. Qualquer coisa que eu diga será pouco para expressar minha eterna gratidão por abrir as portas da sua “casa”, toda confiança em meu trabalho, todo carinho, atenção, ensinamentos, puxões de orelha, mas acima de tudo pela amizade que levaremos para sempre. Obrigado pelos cafés com proza de todas as manhãs, com conselhos e direcionamento sobre a vida científica e pessoal.

A minha querida amiga Edna Paulo Diniz, obrigado pela amizade, carinho e confiança durante todos esses anos.

Aos queridos, dedicados e habilidosos amigos que a pesquisa me deu, Leandro e Maikon. Obrigado por todo suporte e risadas durante todo este longo caminho. Sem vocês nada seria possível.

Aos amigos do Laboratório de Hipertensão Experimental do Instituto do Coração: Paula, Camila, Bruno, Nathalia, Leonardo, Amanda, Ivana, Sílvia, Oscar, Katia. Obrigado pelos socorros e pelos melhores momentos dessa caminhada.

Aos queridos Dra Fernanda Consolim-Colombo, Dra Katia De Angelis e Paulo Magno Martins Dourado, por todas as colaborações e confiança.

A todos os amigos da divisão de experimentação do Instituto do Coração.

A minha querida amiga Márcia Gozzani, pela amizade, carinho e confiança em meu trabalho, sem você não chegaria até aqui.

A equipe da Patologia do Instituto do Coração, em especial a Solange Consorti pelas suas mãos habilidosas.

A Andressa Godoy Amaral, pelos socorros durante as análises dos materiais.

Ao Prof. Dr. Bruno Rodrigues pela disponibilidade na discussão dos resultados.

A minha “mãe cardiológica” Fernanda Fontalva Cordeiro. Obrigado por anos atrás abrir a porta da sua casa, que hoje é nossa, e confiar em mim, me ensinando, guiando e trilhando meu caminho na caminhada da vida da cardiologia veterinária. Obrigado pelas risadas, amizade e confiança em seguir ao seu lado cuidando do nosso filho: Spécialité Diagnóstico Veterinário.

A minha família de coração: Deborah, João e Pedro Henrique. Obrigado por todo carinho e suporte de sempre.

Aos grandes amigos de toda uma vida: Bruno e Caio. Obrigado por estarem comigo nos melhores e piores momentos.

Aos amigos do Spécialité Diagnóstico Veterinário.

Aos amigos da Clínica Veterinária Ponta Porã, em especial Paulo César Conelian e Aloísio Gelsi.

A todos os amigos que estiveram mais distantes durante o período dessa longa caminhada, pela sua compreensão.

“O correr da vida embrulha tudo,  
a vida é assim: esquenta e esfria,  
aperta e daí afrouxa, sossega e  
depois desinquieta. O que ela  
quer da gente é coragem”  
Guimarães Rosa

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	12
1.1	Epidemiologia da doença cardiovascular.....	12
1.2	Infarto do miocárdio e remodelamento .....	13
1.3	Diabetes .....	16
1.4	Empagliflozina.....	18
2	Hipótese .....	21
3	Justificativa .....	22
4	Objetivos.....	23
4.1	Objetivos específicos .....	23
5	Materiais e métodos .....	24
5.1	Modelo animal.....	24
5.2	Procedimentos.....	25
5.2.1	Avaliação ecocardiográfica.....	27
5.2.2	Indução do diabetes .....	28
5.2.3	Infarto agudo do miocárdio.....	29
5.2.4	Canulação da artéria e veia femoral.....	29
5.2.5	Análise da Pressão Arterial (PA), da Frequência Cardíaca (FC) e da variabilidade da PA e da FC .....	30
5.2.6	Sensibilidade dos pressoreceptores .....	32
5.2.7	Dosagem de glicose e triglicérides séricos .....	33
5.2.8	Eutanásia .....	33
5.2.9	Descarte dos animais.....	34
5.2.10	Análise histológica .....	34
5.2.11	Análise quantitativa das fibras colagênicas .....	35
5.2.12	Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes .....	36
5.2.12.1	Oxidação de proteínas (Carbonilas).....	36
5.2.12.2	NADPH oxidase .....	37
5.2.12.3	Peróxido de hidrogênio .....	37
5.2.12.4	Catalase (CAT).....	38
5.2.12.5	Superóxido dismutase (SOD) .....	38
5.2.12.6	Potencial antioxidante não enzimático .....	39
5.2.12.7	Nitritos plasmáticos.....	40
5.2.13	Medida da expressão das proteínas relacionadas a homeostasia do cálcio intracelular .....	40
5.3	Análise estatística .....	41
6	Resultados.....	43
6.1	Efeitos da Empagliflozina sobre o Diabetes Mellitus .....	43

6.1.1 Avaliação metabólica.....	43
6.1.1.1 Peso Corporal .....	43
6.1.1.2 Glicemia .....	45
6.1.1.3 Triglicerídeos .....	48
6.1.2 Avaliação hemodinâmica.....	50
6.1.2.1 Pressão arterial sistólica (PAS).....	50
6.1.2.2 Pressão arterial diastólica (PAD).....	51
6.1.2.3 Pressão arterial média (PAM).....	52
6.1.2.4 Pressão de pulso.....	52
6.1.2.5 Frequência cardíaca média (FCM) .....	53
6.1.2.6 Resposta bradicárdica .....	54
6.1.2.7 Resposta taquicárdica.....	55
6.1.2.8 Sensibilidade barorreflexa espontânea .....	56
6.1.2.9 Análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC).....	57
6.1.2.10 Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica .....	57
6.1.3 Avaliação ecocardiográfica .....	59
6.1.3.1 Parâmetros morfométricos .....	59
6.1.3.2 Parâmetros de função sistólica.....	59
6.1.3.3 Parâmetros de função diastólica .....	61
6.1.4 Quantificação do colágeno em tecido cardíaco .....	63
6.1.5 Expressão de proteínas cardíacas.....	65
6.1.5.1 Expressão de proteínas envolvidas na regulação intracelular do cálcio .....	65
6.1.5.2 Expressão de proteínas de matriz extracelular .....	66
6.1.6 Estresse oxidativo .....	68
6.2 Efeitos da Empagliflozina sobre o infarto agudo do miocárdio .....	70
6.2.1 Avaliação metabólica.....	70
6.2.1.1 Peso Corporal .....	70
6.2.1.2 Glicemia .....	71
6.2.1.3 Triglicerídeos .....	73
6.2.2 Avaliação hemodinâmica.....	75
6.2.2.1 Pressão arterial sistólica (PAS).....	75
6.2.2.2 Pressão arterial diastólica (PAD).....	76
6.2.2.3 Pressão arterial média (PAM).....	76
6.2.2.4 Pressão de pulso.....	77
6.2.2.5 Frequência cardíaca média (FCM) .....	78
6.2.2.6 Resposta bradicárdica .....	79
6.2.2.7 Resposta taquicárdica.....	80

6.2.2.8	Sensibilidade barorreflexa espontânea .....	81
6.2.2.9	Análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) .....	82
6.2.2.10	Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica .....	85
6.2.3	Avaliação ecocardiográfica .....	85
6.2.3.1	Parâmetros morfométricos .....	85
6.2.3.2	Parâmetros de função sistólica.....	87
6.2.3.3	Parâmetros de função diastólica .....	89
6.2.4	Quantificação do colágeno em tecido cardíaco .....	91
6.2.5	Expressão de proteínas cardíacas.....	94
6.2.5.1	Expressão de proteínas envolvidas na regulação intracelular do cálcio .....	94
6.2.5.2	Expressão de proteínas de matriz extracelular .....	95
6.2.6	Estresse oxidativo .....	98
6.3	Efeitos da Empagliflozina sobre o infarto agudo do miocárdio em animais diabéticos .....	100
6.3.1	Avaliação metabólica.....	100
6.3.1.1	Peso Corporal .....	100
6.3.1.2	Glicemia .....	103
6.3.1.3	Triglicerídeos .....	106
6.3.2	Avaliação hemodinâmica.....	108
6.3.2.1	Pressão arterial sistólica (PAS).....	108
6.3.2.2	Pressão arterial diastólica (PAD).....	109
6.3.2.3	Pressão arterial média (PAM).....	110
6.3.2.4	Pressão de pulso.....	111
6.3.2.5	Frequência cardíaca média (FCM) .....	112
6.3.2.6	Resposta bradicárdica .....	113
6.3.2.7	Resposta taquicárdica.....	114
6.3.2.8	Sensibilidade barorreflexa espontânea .....	115
6.3.2.9	Análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) .....	116
6.3.2.10	Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica .....	121
6.3.3	Avaliação ecocardiográfica .....	124
6.3.3.1	Parâmetros morfométricos .....	124
6.3.3.2	Parâmetros de função sistólica.....	126
6.3.3.3	Parâmetros de função diastólica .....	129
6.3.4	Quantificação do colágeno em tecido cardíaco .....	131
6.3.5	Expressão de proteínas cardíacas.....	133
6.3.5.1	Expressão de proteínas envolvidas na regulação intracelular do cálcio .....	133
6.3.5.2	Expressão de proteínas de matriz extracelular .....	135
6.3.6	Estresse oxidativo.....	138

7 Discussão .....	141
7.1 Efeitos da empagliflozina sobre o diabetes mellitus.....	141
7.2 Efeitos da empagliflozina sobre o infarto agudo do miocárdio .....	146
7.3 Efeitos da empagliflozina sobre o infarto agudo do miocárdio em animais diabéticos .....	151
8 Conclusão.....	159
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	161

## RESUMO

Silva BD. Estudo do efeito cardioprotetor da Empagliflozina no infarto agudo do miocárdio em ratos Wistar com diabetes induzida por estreptozotocina [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Sabidamente, as principais causas de morte na população mundial, são as doenças cardiovasculares, sendo o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) a manifestação clínica mais expressiva em nosso meio. O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença de origem endócrina extremamente prevalente na população mundial e capaz de gerar diversas complicações cardiovasculares, elevando o risco de ocorrência do IAM nos pacientes. Durante estudos clínicos com a empagliflozina, inibidor seletivo do co-transportador de sódio e glicose nos rins, em pacientes com DM tipo 2 e portadores de doença cardiovascular, observou-se redução significativa da mortalidade e no número de hospitalizações causados pelas doenças cardiovasculares. Neste protocolo, testamos o efeito de diferentes doses de empagliflozina na proteção miocárdica em diferentes situações: em animais diabéticos, em animais infartados e em animais diabéticos infartados. Para tal, foram utilizados ratos wistar machos divididos em 10 grupos: controle, diabéticos, diabéticos e tratados com empagliflozina 3 mg/kg, diabéticos e tratados com empagliflozina 10 mg/kg, infartados, infartados e tratados com empagliflozina 3 mg/kg, infartados e tratados com empagliflozina 10 mg/kg, infartados e diabéticos, infartados diabéticos e tratados com empagliflozina 3 mg/kg e infartados diabéticos e tratados com empagliflozina 10 mg/kg. Foram realizadas avaliações metabólicas, hemodinâmicas, ecocardiográficas, histológicas, expressão das proteínas relacionadas ao manejo de cálcio intracelular e de matriz extracelular e de estresse oxidativo nos animais dos grupos descritos. O tratamento com empagliflozina em diferentes doses se mostrou eficaz em reverter os prejuízos hemodinâmicos provocados pelo diabetes mellitus, pelo infarto do miocárdio e pela associação de infarto e diabetes mellitus. Notou-se também, melhora da função ventricular pela ecocardiografia nos animais tratados (melhora de em média 20% na mudança fracional de área). Foi observada ainda, redução na deposição de colágeno no tecido ventricular (entre 50 e 60%) nas doses utilizadas de empagliflozina e mudanças na expressão das proteínas relacionadas ao manejo do cálcio intracelular e de matriz extracelular, assim como melhora do perfil antioxidante em animais tratados. Em conclusão, o tratamento com empagliflozina melhora a função ventricular nos animais infartados (sistólica e diastólica) e infartados diabéticos (diastólica e sistólica) provavelmente por redução da deposição de colágeno e modulação do estresse oxidativo e das proteínas associadas ao manejo do cálcio.

**Palavras-chave:** Ratos Wistar. Diabetes mellitus. Infarto do miocárdio. Empagliflozina. Ecocardiografia. Colágeno. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Silva BD. Study of the cardioprotective effect of Empagliflozin on acute myocardial infarction in Wistar rats with streptozotocin-induced diabetes [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Undoubtedly, the leading causes of death in the global population are cardiovascular diseases, with Acute Myocardial Infarction (AMI) being the most significant clinical manifestation in our midst. Diabetes Mellitus (DM) is an endocrine disease extremely prevalent in the global population, capable of generating various cardiovascular complications, increasing the risk of AMI occurrence in patients. Clinical studies with empagliflozin, a selective inhibitor of sodium-glucose co-transporter in the kidneys, in patients with type 2 DM and cardiovascular disease have shown a significant reduction in mortality and the number of hospitalizations caused by cardiovascular diseases

In this protocol, we tested the effect of different doses of empagliflozin on myocardial protection in different situations: in diabetic animals, infarcted animals, and diabetic-infarcted animals. For this purpose, male Wistar rats were divided into 10 groups: control, diabetics, diabetics treated with empagliflozin 3 mg/kg, diabetics treated with empagliflozin 10 mg/kg, infarcted, infarcted treated with empagliflozin 3 mg/kg, infarcted treated with empagliflozin 10 mg/kg, infarcted diabetics, infarcted diabetic treated with empagliflozin 3 mg/kg, and infarcted diabetic treated with empagliflozin 10 mg/kg. Metabolic, hemodynamic, echocardiographic, histological, expression of proteins related to intracellular calcium handling and extracellular matrix, and oxidative stress assessments were performed in animals from the described groups.

Treatment with empagliflozin at different doses was effective in reversing the hemodynamic impairments caused by diabetes mellitus, myocardial infarction, and the combination of infarction and diabetes mellitus. There was also an improvement in ventricular function by echocardiography in treated animals (an average of 20% improvement in fractional area change). Furthermore, a reduction in collagen deposition in ventricular tissue (between 50 and 60%) was observed at the doses of empagliflozin used, along with changes in the expression of proteins related to intracellular calcium handling and extracellular matrix, as well as improvement in the antioxidant profile in treated animals. In conclusion, treatment with empagliflozin improves ventricular function in infarcted animals (systolic and diastolic) and infarcted diabetics (diastolic and systolic), likely due to reduced collagen deposition and modulation of oxidative stress and proteins associated with calcium handling.

**Keywords:** Wistar rats. Diabetes mellitus. Myocardial infarction. Empagliflozin. Echocardiography. Collagen. Oxidative stress.

## **1 Introdução**

### **1.1 Epidemiologia da doença cardiovascular**

Atualmente, as doenças cardiovasculares são as responsáveis pelo maior número de óbitos no mundo (mais de 17 milhões, no ano de 2008)<sup>(1)</sup>. Entre elas podemos citar a hipertensão arterial, doença coronariana, doença cerebrovascular, doença cardíaca reumática, entre outras. Hoje se constituem como as principais causas de morte no mundo e em 2012 responderam por aproximadamente 17,9 milhões de mortes, o que representa 32% do total de mortes no mundo durante o período citado.<sup>(2)</sup>

Sabidamente, o infarto agudo do miocárdio (IAM) é considerado a principal causa de morte por doenças cardiovasculares no Brasil. No período correspondente entre os anos 1996 e 2011, foi o responsável pela morte de aproximadamente 66.000 pessoas anualmente, segundo dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde, com um aumento de 48% de ocorrência no período.<sup>(3)</sup>

As taxas de sobrevivência de pacientes pós infarto do miocárdio vem tendo aumentos significativos nas últimas décadas devido a descoberta de técnicas de reperfusão miocárdica, assim como de drogas capazes de diminuir o dano miocárdio pela redução do processo inflamatório e do estresse oxidativo do músculo afetado pela hipóxia e sua consequente redução do remodelamento cardíaco pós infarto.<sup>(4)</sup>

Estima-se que o desenvolvimento de doença cardiovascular em pacientes portadores de Diabetes Mellitus, ocorra aproximadamente 15 anos antes dos

indivíduos saudáveis, tratando-se de um importante fator de risco para o desenvolvimento da doença.(5)

Para cada ano de duração do DM tipo II, calcula-se que o risco de desenvolvimento de doença cardiovascular (DCV) seja aumentado em 86%, porém, a duração da doença não pode ser associada à gravidade da DCV, quando presente.(6)

Nos pacientes diabéticos sem história de DCV, o risco de mortalidade após evento é igual ao dos pacientes sem diabetes, mas com história de DCV.(6)

## **1.2 Infarto do miocárdio e remodelamento**

O IAM é o resultado da isquemia prolongada das células musculares cardíacas, provocada pela interrupção do fluxo sanguíneo em determinada região do coração, em decorrência da deposição de placas de gordura nas artérias coronárias, aumento da produção de radicais livres e/ou supressão dos mecanismos antioxidantes.(7)

Em consequência ao processo isquêmico, observa-se o surgimento de diversos marcadores que são produzidos ao longo do tempo em ordem bastante precisa e definida, sendo responsáveis pelo surgimento de alterações na complacência ventricular, sincronia das funções sistólica e diastólica ventricular. O reparo tecidual no miocárdio após a ocorrência do IAM é extremamente complexo e possui o envolvimento de diversos mecanismos e populações celulares. Processos inflamatórios excessivos e desbalanço de fatores anti e pró

oxidantes no período pós-infarto podem estar relacionados ao surgimento de maiores áreas de infarto, remodelamento e disfunção cardíaca. (8)

O principal mecanismo de morte celular apresentado pelos miócitos submetidos a isquemia é a necrose de coagulação, assim como a ocorrência de apoptose também é observada em menor frequência. O processo de morte celular resulta na liberação de seu conteúdo intracelular, iniciando uma complexa ativação dos mecanismos de imunidade inata e consequente resposta inflamatória.(9)

Os principais mecanismos relacionados aos processos inflamatórios pós-infarto são a ativação do sistema complemento, produção de espécies reativas de oxigênio e de citocinas.(10)

Ainda, durante o processo inflamatório no período após a ocorrência da hipóxia miocárdica, pode-se observar o aumento do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-7 (IL7), responsáveis por exacerbar o processo inflamatório e reduzir o período de vida dos miócitos.(11)

O remodelamento cardíaco a seguir destes processos, se deve às alterações na composição, função, tamanho, geometria ou massa ventricular, sendo que as alterações celulares e moleculares envolvidas no processo de remodelamento tanto na área isquêmica, como nas regiões adjacentes são as responsáveis pelo aparecimento da disfunção ventricular.(12)

A ecocardiografia possui papel importante no diagnóstico das alterações ventriculares secundárias ao IAM, assim como no estabelecimento do prognóstico pós-IAM. Ainda, é capaz de descartar outras causas de dor precordial, como pericardite, embolia pulmonar e dissecção de aorta. A avaliação

sistólica do Ventrículo Esquerdo (VE) pode ser realizada de forma subjetiva/qualitativa ou quantitativa. A avaliação global é baseada em mudanças no tamanho e volume ventricular entre dois pontos do ciclo cardíaco e é dinâmica. Diversas técnicas são descritas para a avaliação sistólica do VE, porém, além das técnicas já consagradas na avaliação, foi observado o desenvolvimento de novas técnicas ecocardiográficas, que permitem uma melhor ou mais precoce avaliação das disfunções miocárdicas, fluxos intracardíacos e transvalvares possibilitando maior sobrevida aos pacientes, na medida em que se torna possível início rápido da terapia. Para tal, são utilizadas técnicas ecocardiográficas como o *strain*. O *strain* é tido como a integral do *strain rate*, ou seja, enquanto o *strain rate* representa a velocidade de deformação do tecido em relação ao tempo, o *strain* representa o percentual de deformação. A curva obtida pelo *strain* é mais limpa e com menor quantidade de ruídos que a do *strain rate*, levando a menor variação de resultados inter observador. Normalmente, os valores de *strain* encontrados, são homogêneos em todo o miocárdio, porém, o *strain* radial é aproximadamente o dobro do *strain* longitudinal. O *strain* tem sido utilizado na detecção precoce de deterioração da função sistólica principalmente em casos de hipertensão, insuficiência mitral assintomática, hipertensão pulmonar, rejeição após transplante cardíaco, cardiopatias congênitas, obesidade, ateromatose subclínica, diabetes e esclerose sistêmica.(13)

Como já descrito anteriormente, acredita-se que uma resposta inflamatória exacerbada e/ou muito duradoura no pós-infarto, pode estar relacionada ao surgimento do remodelamento cardíaco, levando assim à disfunção ventricular, um dos principais preditores de mortalidade pós-infarto.(9)

De fato, demonstramos recentemente que o aumento da atividade vagal, por meio da administração de droga anticolinesterásica (piridostigmina) ou por treinamento físico, é capaz de alterar o perfil inflamatório que se segue ao IAM em ratos. O uso dessas duas abordagens terapêuticas, aumenta os componentes anti-inflamatórios celulares (Macrófagos tipo 2 e FOX P3) e reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias na área de risco pós IAM. A consequência funcional dessa modulação é uma melhora na função do ventrículo esquerdo.(14)(15)(16)

### **1.3 Diabetes**

O Diabetes Mellitus (DM) possui caráter crônico e é caracterizado pelo aumento dos níveis séricos de glicose (hiperglicemia), ocorrendo como consequência da inadequada produção de insulina pelo pâncreas ou pela utilização ineficaz da insulina produzida.(17)

Clinicamente, o DM pode ser classificado em: Diabetes Mellitus tipo 1, Diabetes Mellitus tipo 2, Diabetes Mellitus gestacional ou outros tipos específicos de Diabetes Mellitus ocorrendo como consequência de outros processos ou agentes.(17)

O DM tipo 1 ocorre em aproximadamente 5 a 10% dos casos e se dá pela destruição das células beta do pâncreas, provocando geralmente total deficiência de insulina. Seu desenvolvimento está relacionado a uma alteração autoimune, provocando a formação de anticorpos contra células beta do pâncreas.(18)

A forma mais comum do DM, o tipo 2, corresponde a 90 a 95% dos casos de DM e ocorre pela falha na secreção e na ação da insulina, assim como na metabolização hepática da glicose. Antes mesmo do aparecimento dos sintomas da DM, já pode ser observada resistência insulínica. Seu desenvolvimento está ligado a fatores genéticos e ambientais, principalmente sedentarismo, dietas ricas em lipídeos, envelhecimento e obesidade.(17)

Seu caráter crônico e a gravidade de suas complicações durante a evolução da doença e seus meios de controle obrigam grandes investimentos financeiros por parte dos pacientes e do sistema de saúde pública. Estima-se o custo da DM entre 2,5 e 15% dos gastos de saúde em um país, de acordo com a prevalência e os meios de tratamento disponíveis.

Nosso grupo tem demonstrado repetidamente as alterações associadas ao IAM em animais diabéticos.(19)(20)(21), assim como o papel protetor do treinamento físico frente a esse quadro.(22)

Adicionalmente, temos demonstrado que a hiperglicemia pode ser protetora nos primeiros dias de IAM em animais com DM experimental.(23)(24)

Dessa forma, o uso de substâncias que contribuam para o controle da glicose plasmática parece ser benéfico, como já demonstrado em diversos trabalhos com uso da metformina, um dos medicamentos mais populares e utilizados no tratamento da DM tipo 2, que demonstram menor risco de ocorrência de IAM, AVC, fibrilação atrial e redução da mortalidade total.

## 1.4 Empagliflozina

As gliflozinas (canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina) são substâncias responsáveis pela inibição do co-transportador de sódio e glicose 2 (SGLT2) e foram desenvolvidas essencialmente para o tratamento da DM tipo 2. Os rins apresentam importante papel na homeostasia da glicose, onde esta é reabsorvida quase totalmente nos túbulos proximais. O SGLT2 é predominantemente expresso no segmento S1 dos túbulos proximais e é responsável pela absorção renal de aproximadamente 90% da glicose. Desta forma, a inibição da SGLT2 promovendo excreção renal de glicose, é potencialmente capaz de contribuir para um adequado controle glicêmico.(25)

Sua história se inicia nos anos 1960 e 1970, quando houve inicialmente a identificação dos transportadores de glicose presentes nos túbulos renais.(26) Ainda, na década de 1980, o SGLT2 foi isolado e caracterizado como uma proteína fundamental na reabsorção renal de glicose.(27) Já mais recentemente, na década de 1980 surgiram os primeiros estudos pré-clínicos e modelos animais na tentativa de se promover a inibição destes co-transportadores.(28)

Os primeiros inibidores do SGLT2 surgiram e foram testados em ensaios clínicos, onde apresentaram boa eficácia no controle glicêmico de pacientes diabéticos. Tendo sido a dapagliflozina, a primeira gliflozina a ser aprovada pelo FDA (US Food and Drug Administration) para o tratamento da DM tipo 2.(29)

Atualmente, os inibidores do SGLT2, tem se mostrado eficazes no controle glicêmico, na redução da hemoglobina glicada, perda de peso, redução da pressão arterial e ainda, apresentam melhoras na função cardiovascular e possuem potencial efeito protetor renal.(30–34)

Empagliflozina é um potente inibidor seletivo da SGLT2, apresentando seletividade 2500 vezes maior para a SGLT2 do que para a SGLT1, sendo desta forma, uma potente droga capaz de promover excreção urinária de glicose.<sup>(25)</sup>

Quando administrada pela via oral, a empagliflozina é absorvida em aproximadamente 1,25 hora e meia vida de aproximadamente 11,7 horas.<sup>(25)</sup>

Durante estudo clínico (EMPA-REG OUTCOME®) com uso da empagliflozina em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e doença cardiovascular previamente diagnosticada, a droga foi capaz de reduzir a mortalidade por causas cardiovasculares, o número de hospitalizações por insuficiência cardíaca e a mortalidade geral, porém o mecanismo gerador desta proteção miocárdica ainda não está elucidado.<sup>(34)</sup>

Apesar do número crescente de artigos científicos publicados, ainda são poucos os dados sobre a repercussão do uso da empagliflozina em diferentes funções.

Entretanto, estudos de 2016 mostram em DM tipo 2 redução da incidência de DCV, independentemente de alterações metabólicas e hemodinâmicas<sup>(35)(36)(37)(38)</sup>

Adicionalmente, fica clara a redução da mortalidade total em diferentes estudos clínicos, o que levou os pesquisadores a proporem o efeito diurético da substância como causador da redução da morbidade CV, através de mecanismos ainda pouco esclarecidos, porém, especula-se que possam incluir o efeito diurético da droga com concomitante redução do volume plasmático e melhor controle da pressão arterial e/ou controle do processo inflamatório. Entretanto, as evidências não tem dado suporte pleno a esta hipótese. Com

relação aos mecanismos de proteção cardiovascular, são escassos os estudos clínicos ou experimentais. Entretanto, é comum o conceito de que as gliflozinas poderiam proteger o miocárdio contra as alterações provocadas pela isquemia por oclusão coronariana.

Atualmente, devido ao seu alto nível de evidências científicas a cerca de seu potencial cardioprotetor, a utilização das gliflozinas passou a ser indicada com alto grau de evidências no tratamento da insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida, e ainda, na insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada.(39)

## **2 Hipótese**

O tratamento com empagliflozina, possui papel protetor do miocárdio no pós-IAM de animais diabéticos e normoglicêmicos e esse efeito pode ser dose dependente. Essa proteção pode estar relacionada a modulação da carga de volume relacionada à diurese osmótica associada aos inibidores do SGLT2 e/ou a alterações na estrutura e função cardíacas, em especial, por meio da modulação do estresse oxidativo, no manejo das proteínas relacionadas ao cálcio e finalmente na deposição de colágeno pós evento. Além disso, um potencial efeito benéfico sobre o balanço simpato-vagal cardíaco pode estar associado a essa resposta, decorrentes de adaptações hemodinâmicas que se seguem ao uso do fármaco.

### **3 Justificativa**

A prevalência e mortalidade do IAM, exige estudos de novas drogas que possam prevenir sua ocorrência, evitar complicações e aumentar a sobrevivência dos pacientes. Dessa forma, estudos experimentais e ensaios clínicos, podem contribuir para demonstrar o possível efeito protetor cardíaco bem como os mecanismos pelos quais a empagliflozina induz essa proteção em indivíduos infartados, diabéticos ou não diabéticos.

## **4 Objetivos**

Avaliar o grau de proteção miocárdica e tentar elucidar os mecanismos de ação da empagliflozina, no remodelamento cardíaco pós infarto em animais diabéticos e não diabéticos.

### **4.1 Objetivos específicos**

Determinar se nos grupos tratados com empagliflozina, os animais apresentaram alteração hemodinâmica por meio do registro de variáveis hemodinâmicas (pressão arterial e frequência cardíaca); e verificar alterações no balanço simpato-vagal para o coração, por meio da análise da variabilidade de frequência cardíaca.

Determinar se nos grupos tratados com empagliflozina, em diferentes doses, os animais apresentaram menor remodelamento e melhores índices de função cardíaca no período pós-IAM, por meio da análise morfo-funcional com o ecodopplercardiograma.

Determinar se nos grupos tratados com empagliflozina, em diferentes doses, os animais apresentaram menor deposição de colágeno ventricular no período pós-IAM, por meio da análise histológica, que pudessem justificar modificações da função contrátil.

Determinar se nos grupos tratados com empagliflozina, em diferentes doses, a presença de redução do estresse oxidativo e mudanças na expressão de proteínas de matriz extracelular e naquelas relacionados ao manejo do cálcio intracelular.

## 5 Materiais e métodos

### 5.1 Modelo animal

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus*, machos, da linhagem Wistar, peso aproximado de 250 gramas e idade média de 3 meses.

Os animais eram provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e foram transportados até o Instituto do Coração (InCor) em caixas plásticas através de veículo adequado, com controle de temperatura. Foram mantidos no biotério da divisão de experimentação do InCor em caixas plásticas, em ambiente com adequado controle de luminosidade (ciclos de 12 horas de luz/escuro) e temperatura (22° a 24°), onde receberam água e ração comercial normoprotéica *ad libitum*.

Os animais foram divididos em 10 grupos, de 10 (dez) animais cada:

Grupos:

-Grupo CTL – animais sem intervenções e não tratados

-Grupo DM – animais com DM induzida por estreptozotocina

-Grupo DM+EMPA3 – animais com DM tratados com empagliflozina 3 mg/kg

-Grupo DM+EMPA10 – animais com DM tratados com empagliflozina 10 mg/kg

-Grupo IAM – animais infartados

-Grupo IAM+EMPA3 – animais infartados e tratados com empagliflozina 3 mg/kg

-Grupo IAM+EMPA10 – animais infartados e tratados com empagliflozina 10 mg/kg

-Grupo DM+IAM – animais com DM e infartados

-Grupo DM+IAM+EMPA3 – animais diabéticos, infartados e tratados com empagliflozina 3 mg/kg

-Grupo DM+IAM+EMPA10 – animais diabéticos, infartados e tratados com empagliflozina 10 mg/kg

O número de animais em cada grupo justificou-se pela experiência prévia de nosso grupo, que alcançou diferenças estatísticas com número de amostra de no 8 a 10 animais por grupo, na sobrevivência pós IAM e na avaliação morfofuncional pelo ecocardiograma.(23)(22)(15)(14)

## **5.2 Procedimentos**

Os animais dos grupos DM, DM+EMPA3, DM+EMPA10, DM+IAM, DM+IAM+EMPA3, DM+IAM+EMPA10 foram submetidos a indução do diabetes através da aplicação de estreptozotocina conforme protocolo descrito em 5.2.2.

Após 14 dias da confirmação do estabelecimento do quadro de diabetes, foi realizada ligadura da artéria coronária esquerda a fim de provocar infarto do

miocárdio, nos animais dos grupos infartados (DM+IAM, DM+IAM+EMPA3 e DM+IAM+EMPA10).

Os animais foram monitorados e medicados durante 14 dias após a realização do procedimento cirúrgico. Nos grupos DM+EMPA3, DM+EMPA10, DM+IAM+EMPA3 e DM+IAM+EMPA10, a administração da empagliflozina, nas doses de 3 mg/Kg ou 10 mg/kg, respectivamente, a cada 24 horas, foi realizada através de gavagem oral.

Após 15 dias, foi realizado exame ecocardiográfico a fim de se avaliar a função cardíaca destes animais,

Em seguida ao exame ecocardiográfico, foi realizada eutanásia dos animais e coletados os materiais para futuras análises.

Os animais dos grupos IAM, IAM+EMPA3 e IAM+EMPA10, passaram pelos mesmos procedimentos, com exceção da administração de estreptozotocina que foi substituída por tampão citrato nestes grupos normoglicêmicos. Nos grupos IAM+EMPA3 e IAM+EMPA10, a administração da droga, na dose de 3 mg/Kg ou 10 mg/kg, respectivamente, a cada 24 horas, foi realizada através de gavagem oral.

Os animais dos grupos CTL, não foram submetidos a indução do diabetes e nem a ligadura da artéria coronária. E os animais dos grupos CTL+EMPA3 e CTL+EMPA10 receberam empagliflozina na dose de 3 mg/Kg ou 10 mg/kg, respectivamente, a cada 24 horas (por 14 dias), através de gavagem oral.

Adicionalmente, todos os animais receberam analgesia pós cirurgia (cloridrato de tramadol, 10 mg/kg, a cada 12 horas, durante 2 dias), seja de canulação ou de ligadura da artéria coronária.

### **5.2.1 Avaliação ecocardiográfica**

Para a realização do exame ecocardiográfico os animais sofreram indução anestésica em câmara anestésica através da inalação de mistura de oxigênio e Isoflurano a 5%. Após a indução, o plano anestésico foi mantido com mistura de oxigênio e Isoflurano a 3%, com respiração espontânea em máscara.

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

As mensurações ecocardiográficas seguiram as padronizações do Comitê de Padronização da Sociedade Americana de Ecocardiografia.

A partir do corte longitudinal da via de saída do ventrículo esquerdo foram obtidas as seguintes medidas: diâmetro da artéria aorta e do átrio esquerdo. Pelos cortes apicais 4 e 5 câmaras foram obtidos: velocidade máxima da onda E, velocidade máxima da onda A, tempo de desaceleração da onda E, tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), relação E/A, velocidade máxima da onda E' do septo interventricular, velocidade máxima da onda A' do septo interventricular, relação E'/A', relação E/E', tempo de ejeção.

Através do corte transverso do ventrículo esquerdo foram obtidos: espessura do septo interventricular (sistólica e diastólica), espessura da parede livre do ventrículo esquerdo (sistólica e diastólica), diâmetro diastólico, diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, massa do ventrículo esquerdo, fração de encurtamento e fração de ejeção. Foi ainda, realizado o cálculo da variação fracional da área do VE (FAC), para melhor avaliação da função sistólica

Também, em amostra de cada um dos grupos, foi realizada avaliação da área de infarto e planimetria para sua quantificação. Serão realizadas as medidas de deformação miocárdica longitudinal, radial e circunferencial através do *Strain*.

### **5.2.2 Indução do diabetes**

Optou-se pelo modelo que utiliza a estreptozotocina isoladamente. Foi realizado jejum alimentar de 6 horas e em seguida, os animais foram anestesiados com Isoflurano (1mL/mL, na concentração de 2,5%). Os animais foram posicionados em decúbito esternal e foi aplicado, na veia caudal, 50 mg/kg de estreptozotocina (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA) dissolvida em tampão citrato (0,01 M, pH 4,5).

Após 3 dias da indução do DM, foram realizadas dosagens da glicose sérica em dias alternados. Para a coleta foi realizado jejum alimentar de 4 horas e foi coletada uma gota de sangue da cauda para análise em glicosímetro portátil.

Foram considerados diabéticos os animais que apresentarem glicemia maior que 250 mg/dL em duas medidas seguidas.

### **5.2.3 Infarto agudo do miocárdio**

Os animais foram anestesiados com associação de Quetamina (50 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) e foram submetidos a respiração artificial (Harvard Aparatus, Boston, EUA). Foi realizada tricotomia adequada do tórax e os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. Foi realizada toracotomia através de pequena incisão no quarto espaço intercostal esquerdo e afastamento da musculatura intercostal com auxílio de afastadores. Em seguida, realizou-se secção do pericárdio e visualização da artéria coronária esquerda. Com fio cirúrgico de nylon USP 6.0, realizou-se a ligadura da artéria coronária esquerda. Foi realizada drenagem do pneumotórax com agulha 5x7, imediatamente após a toracorráfia com fio cirúrgico de nylon USP 5.0. No pós cirúrgico imediato os animais receberam analgesia com cloridrato de tramadol (10 mg/kg, via intramuscular, a cada 12 horas, durante 2 dias).(40)

### **5.2.4 Canulação da artéria e veia femoral**

Para os procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados com gás isoflurano (1mL/ml) a 2,5%, e então posicionados em mesa cirúrgica aquecida, em decúbito dorsal para a realização de uma pequena incisão na região inguinal por onde foram implantados cateteres, confeccionados com tubos de Micro-Renathane (MRE-025 com diâmetro externo de 0,64mm e diâmetro interno de

0,30mm, Braintree Scientific) e polietileno PE50 e preenchidos com solução fisiológicas e ocluídas com pinos de aço inoxidável. Essas cânulas foram posicionadas no interior da artéria e veia femorais para registro da PA, FC e administração de drogas, respectivamente. Após o implante as cânulas foram exteriorizadas no dorso do animal na região cervical e fixadas com fio de algodão na pele. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições assépticas, sob visão de um microscópio cirúrgico (DF Vasconcelos modelo MCM 5, São Paulo).

Ao término da cirurgia, os animais receberam uma injeção intramuscular de  $10^7$ U/Kg penicilina G (Benzetacil® Fontoura-Wyeth,) e analgésico (10 mg/kg de cloridrato de tramadol).

#### **5.2.5 Análise da Pressão Arterial (PA), da Frequência Cardíaca (FC) e da variabilidade da PA e da FC**

Os valores de PA, FC, variabilidade de frequência cardíaca e da pressão arterial foram calculados com as curvas de pressão registradas 24 horas após o procedimento de canulação da veia e artéria femoral, com o animal acordado. A cânula arterial foi conectada a um transdutor eletromagnético (Blood Pressure XDCR; Kent Scientific, Torrington, CT) que, por sua vez, estava conectado a um pré-amplificador (Stemtech). Sinais de curvas de pressão foram gravados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (Windaq, 2-kHz, DATAQ, Springfield, OH), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 2000 Hz. Os valores de frequência cardíaca foram derivados do sinal pulsátil da pressão arterial. Cada batimento cardíaco foi

identificado através da utilização de algoritmo implementado no Windaq/DATAC, que automaticamente realiza a detecção dos intervalos P-P da onda do evento sistólico e da onda do sinal de pressão arterial. Após esta leitura automática, foi realizada uma verificação por inspeção visual, para identificar e/ou corrigir alguma marcação incorreta. Em seguida foi gerada a série temporal de cada sinal a ser estudado, isto é, o intervalo de pulso cardíaco (tacograma) e da pressão arterial sistólica (sistograma). Os dados foram armazenados em arquivos e utilizados posteriormente na análise espectral. A faixa de frequência de interesse para análise espectral no rato encontra-se no intervalo que vai de 0 até 3Hz. A potência espectral foi integrada em três faixas de frequência de interesse: altas frequências (HF) entre 0,75 e 3,0 Hz, baixas frequências (LF) entre 0,20 e 0,75 Hz e muito baixas frequências (VLF) menores que 0,20 Hz. Devido ao nosso tempo de coleta dos sinais de interesse para a análise espectral, esse estudo não incluiu as faixas de VLF. Os índices baseados na medida dos intervalos RR individualmente, como SDNN (desvio-padrão da média de todos os intervalos RR normais, expresso em milisegundos), representam a variabilidade global e refletem a atividade de ambos, parassimpático e simpático. A variável RMSSD (raiz quadrada da média das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes, expressa em milisegundos, ou seja, o desvio-padrão das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes) reflete predominantemente a modulação vagal para o coração. Esse método vem sendo usado de rotina em estudos de nosso grupo de pesquisas.<sup>(14)(15)</sup>

### 5.2.6 Sensibilidade dos pressorreceptores

Após o registro basal, foi acoplada a cânula posicionada na veia femoral, uma extensão de aproximadamente 20 cm (PE10) para posterior injeção de drogas vasoativas. A sensibilidade dos pressorreceptores foi testada através da infusão de doses crescentes de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company).

Para avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores, o pico máximo ou mínimo da PAM foi reduzido dos valores de PAM do período controle. Da mesma forma, a variação máxima da FC foi reduzida dos valores de FC do período controle, imediatamente antes da infusão das drogas, para posterior quantificação das respostas. A sensibilidade barorreflexa foi avaliada pelo índice calculado através divisão da variação da FC pela variação da PAM.

A fenilefrina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), que se trata de um potente estimulador  $\alpha_1$  cuja ação predominante ocorre nas arteríolas periféricas causando vasoconstrição, foi usada para provocar aumento da pressão arterial. Esse aumento da pressão arterial é seguido de bradicardia reflexa comandada pelos pressorreceptores.

Já, o nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, UA), que trata-se de um potente vasodilatador tanto de arteríolas como de veias, cuja ação ocorre por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3', 5'- guanosina monofosfato (GMP cíclico) na musculatura lisa de vasos e outros tecidos foi usado para provocar queda da pressão arterial. Essa queda é seguida por uma resposta taquicárdica reflexa comandada pelos pressorreceptores.

As doses utilizadas foram: fenilefrina - 0,5, 1, 2, 4, 8 µg; nitroprussiato de sódio – 5, 10, 20, 40, 80 µg.

### **5.2.7 Dosagem de glicose e triglicérides séricos**

A avaliação da glicose foi realizada por meio de glicosímetro portátil (Accu-Chek, Roche Applied Science, IN, EUA) anteriormente a indução do diabetes e posteriormente, no 3º, 7º, 14º, 21º e 28º dia e dos triglicérides (Accutrend GTC, Roche) anteriormente a indução do diabetes e posteriormente, no 15º dia e 30º. Para cada coleta os animais foram submetidos a 4 horas de jejum e foi retirada uma gota de sangue da cauda para cada análise.

### **5.2.8 Eutanásia**

Após a realização do exame ecocardiográfico e o registro da pressão arterial, os animais foram submetidos a eutanásia, por overdose de pentobarbital sódico (90 mg/Kg). Após o animal apresentar parada respiratória foi feita uma toracotomia e coletados 2 ml de sangue por punção do átrio direito para análises posteriores. De alguns grupos de animais foram retirados tecidos frescos e armazenados em nitrogênio líquido que foram posteriormente utilizados para quantificação proteica e outras análises bioquímicas. Outros grupos de animais foram submetidos à perfusão do coração, para posterior análise histológica.

### **5.2.9 Descarte dos animais**

Após coleta de material biológico, as carcaças foram embaladas, identificadas e armazenadas em freezer (-20°C) e destinados a coleta e incineração por empresa terceirizada.

### **5.2.10 Análise histológica**

Após a eutanásia, os animais foram perfundidos com solução de formol 4% tamponado e os tecidos foram coletados e imediatamente fixados em paraformoldeído 4% em tampão fosfato pH 7,0. Em seguida, os materiais fixados foram cortados no sentido transversal dos ventrículos, alocados em cassetes histológicos, desidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°), diafanizados em xilol e emblocados em parafina.

Cada bloco histológico, foi identificado e a partir desses, foram obtidos cortes histológicos de 5 µm de espessura que foram alocados em lâminas de vidro silanizadas.

Para coloração pela hematoxilina-eosina, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, hidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°) e água e corados durante 2 minutos pela Hematoxilina de Harris. Após, estes cortes foram lavados em água corrente e corados com eosina durante 10 minutos. Em seguida, foram lavados em água corrente, desidratados em gradiente alcoólico (95° e 100°), diafanizados em xilol e finalizados com lamínula de vidro e entellan.

Para coloração pelo picrossirius, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, hidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°) e água

e corados durante uma hora em solução 0,1% de *picrossirius red*, dissolvido em solução aquosa saturada de ácido pícrico. Em seguida, foram lavados em água corrente, desidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°), diafanizados em xilol e finalizados com lamínula de vidro e entellan.

### **5.2.11 Análise quantitativa das fibras colagênicas**

Os cortes histológicos preparados e corados com picrossirius, foram utilizados na quantificação das fibras de colágeno.

O corante Sirius Red é uma molécula alongada, com seis grupamentos sulfônicos ácidos e quatro grupamentos cromofóricos diazóicos. Desta forma, os grupamentos sulfônicos interagem fortemente com aminoácidos básicos das moléculas dos diferentes tipos de colágeno, conferindo a elas uma intensa cor vermelha, permitindo sua identificação em cortes histológicos.

As imagens analisadas foram obtidas a partir de digitalização das lâminas histológicas, pelo sistema de digitalização Scanscope CS System (Aperio Technologies, Inc., CA, USA), com objetiva Olympus UPlanSApo 20x com especificações 40x/0.75 acoplada ao scanner.

As imagens digitalizadas, foram transferidas para o software de análises de imagens digitais Aperio ImageScope View (Aperio Technologies, Inc., CA, USA). A partir das imagens digitalizadas, foram delimitadas manualmente as áreas dos ventrículos esquerdo e direito. Desta delimitação, automaticamente foi quantificada pelo software a área total de tecido destes ventrículos, assim como a quantidade de colágeno presente nestes.

### **5.2.12 Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes**

Para a elaboração desta tese, foi avaliado o estresse oxidativo no tecido cardíaco, utilizando diversas técnicas, de forma ampla e baseada na quantificação dos produtos da oxidação de biomoléculas, oxidação de proteínas (carbonilas) pela avaliação de promotores de dano (produção de espécies reativas de oxigênio: peróxido de hidrogênio e NADPH oxidase) ou inibidores de dano (antioxidantes enzimáticos: CAT, SOD e nitritos) e FRAP.<sup>(41)</sup>

Para tal, o tecido cardíaco foi homogeneizado durante 30 segundos em homogeneizador Ultra-Turrax, com buffer fosfato 30 mM com KCl 120mM e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), em concentração 100 nmol/L em isopropanolol e adiciono 10 µL/mL de KCl adicionado. Em seguida, estes homogeneizados foram centrifugados durante 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C e a 3000 rotações/minuto, tendo seu sobrenadante sido congelado em freezer a -80°C para sequência das dosagens específicas.

As proteínas dos tecidos cardíacos foram quantificadas pelo método descrito por Lowry et al<sup>(42)</sup>, utilizando como padrão uma solução de albumina bovina com concentração de 1 mg/mL.

#### **5.2.12.1 Oxidação de proteínas (Carbonilas)**

Foi utilizada a técnica que se baseia na reação das proteínas oxidadas do homogeneizado cardíaco com 2,4 dinitro fenil hidrazina (DNPH) em meio ácido, seguido de sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos e finalmente,

incubação com guanidina. Tendo sido a absorvância das carbonilas medida em espectrofotômetro a 360 nm, em um meio de reação contendo os seguintes reagentes: guanidina (6 M) em ácido clorídrico – HCl – (2,5 M) pH: 2,5; DNPH em HCl (2,5 M); ácido tricloroacético (TCA) 20%; TCA 10%; etanol – acetato de etila 1:1 (V/V).(43)

### **5.2.12.2 NADPH oxidase**

A atividade da enzima NADPH oxidase foi determinada no homogeneizado de tecido cardíaco e avaliada pela produção de superóxido determinado por meio de ELISA. Para este ensaio, foi utilizado buffer fosfato 50 mM contendo EDTA 2 mM e sucrose 150 mM, NADPH 1,3 mM e 10 µL do homogeneizado. A produção de superóxido foi expressa em µmoles/mg de proteína.(44)

### **5.2.12.3 Peróxido de hidrogênio**

O peróxido de hidrogênio foi mensurado pela oxidação de venrího de fenol através da enzima peroxidase rabanete (HRP), originando um composto mensurável a 630 nm. Foi realizada uma curva com água destilada (H<sub>2</sub>O), H<sub>2</sub>O 250 µM, Solução de peroxidase de rabanete (PRS – composto de bufer dextrose), vermelho de fenol (Sigma-Aldrich Corporation) e peroxidase de rabanete tipo II (Sigma-Aldrich Corporation) e hidróxido de sódio (NaOH) (FMaia Gold).

Foram adicionados a placa de Elisa 70  $\mu\text{L}$  de homogeneizado do tecido, com 180  $\mu\text{L}$  PRS e incubados por 25 minutos a temperatura ambiente. Após, foi adicionado 5  $\mu\text{L}$  de NaOH e a leitura foi realizada em equipamento de leitura de placas de Elisa (Robomik, India).(45)

#### **5.2.12.4 Catalase (CAT)**

A atividade da enzima CAT está diretamente relacionada a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio. Assim sendo, o consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pode ser utilizado com medida de atividade da CAT.

O presente ensaio consiste na mensuraçã*i* da redução de absorvância a 240 nm (comprimento de onda onde é possível se identificar maior absorção do peróxido de hidrogênio) em cubas de quartzo. Para tal, foi utilizada uma solução tampão de fosfatos a 50 mmol/L e pH 7,4. Foram então adicionados 970  $\mu\text{L}$  deste tampão e 20  $\mu\text{L}$  de amostra de tecido na cubeta do espectrofotômetro, sendo então a leitura desta medida descontada de um branco de tampão fosfato. A seguir, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio (0,3 mol/L) e foi monitorada a diminuição da absorvância no espectrofotômetro. (46)

#### **5.2.12.5 Superóxido dismutase (SOD)**

Foi utilizada a técnica baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. Foi utilizada a quantificação da enzima em unidades relativas, visto que a determinação de sua concentração e/ou sua atividade em termos de consumo de substrato não são possíveis. Assim, uma unidade de

SOD é definida como a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a velocidade de oxidação do detector. A oxidação do pirogalol leva a formação de um produto colorido, detectado pela espectrofotometria a 420 nm durante 2 minutos. A atividade da SOD foi mensurada pela velocidade de formação de pirogalol oxidado. No meio da reação, foram utilizados 5 µL de homogeneizado, 973 µL de tampão Tris-Fosfato a 50 mmol/L (pH 8,2), 8 µL de pirogalol a 24 mmol/L, 4 µL de CAT a 30 µmol/L. A curva obtida foi utilizada como branco. Foi realizada um curva padrão, com a utilização 3 concentrações de SOD (0,25U, 0,5U e 1U), pela qual foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos.(47)

#### **5.2.12.6 Potencial antioxidante não enzimático**

O ensaio antioxidante para a determinação do poder de redução do íon ferro, FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), se baseia na produção do íon  $\text{Fe}^{2+}$  (forma ferrosa) a partir da redução do íon  $\text{Fe}^{3+}$  (forma férrica) presente no complexo 2,4,6- tripiridil-s-triazina (TPTZ). Assim, a alteração na absorbância, é diretamente relacionada ao poder da redução total de doação de elétrons antioxidantes presentes na reação. Quando esta ocorre, há uma alteração na tonalidade da mistura de reação, passando de roxo claro a um roxo intenso. Quanto maior for a absorbância ou intensidade da coloração, maior será considerado o potencial antioxidante total da amostra. A técnica foi realizada em microplaca, na qual adicionou-se a 290µL de reativo de FRAP (buffer acetato de sódio e ácido acético, pH 3,6; TPTZ 10mM; cloreto férrico hexahidratado 20mM) 10 µl de uma solução-padrão de sulfato ferroso heptahidratado ou 10 µL de

amostra. A microplaca foi incubada durante 5 minutos com agitação à 37°C. A leitura foi realizada a 593nm.(48)

#### **5.2.12.7 Nitritos plasmáticos**

Os níveis de nitritos foram medidos pela reação das amostras de plasma com o reagente de Griess em microplacas em aparelho leitor de Elisa. Nos poços da placa foram adicionados 50 µL de plasma em temperatura ambiente. O total de nitrito tecidual foi estimado a partir de uma curva padrão de absorbância com comprimento de onda de 592 nm.(49)

#### **5.2.13 Medida da expressão das proteínas relacionadas a homeostasia do cálcio intracelular**

As amostras de tecido cardíaco foram homogeneizadas em tampão de homogeneização T-PER (Thermo Fisher Scientific) contendo coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (Thermo Fisher Scientific). A homogeneização foi realizada com o equipamento Bead Ruptor 24 (Omni Inc.), com microesferas de cerâmica de 1,4 mm de diâmetro, a 5000 rpm (movimentos por minuto) por 45 s. O homogenato foi centrifugado a 13400 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante utilizado para a determinação da concentração de proteínas utilizando o reagente Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Quantidades equitativas de proteína foram submetidas a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e transferidas para membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Bio-Rad). O bloqueio foi realizado com BSA 3% ou leite em pó desnatado 5% por 2 h (Tabela 2). As membranas foram incubadas overnight a 4°C com os anticorpos primários específicos para

camundongo anti-fosfolambam total e fosforilado, anti-SERCA-2 e anti-ERK1/2 fosforiladas, seguidas da incubação com anticorpo secundário conjugado a HRP por 1 h, TA (Tabela 1). A revelação foi realizada com Clarity Western ECL (Bio-Rad). O sinal quimioluminescente, por sua vez, foi detectado pelo sistema digital de aquisição de imagens ALLIANCE 4.7 (UVITEC) e quantificado por análise densitométrica com o software Image J. O sinal quimioluminescente de cada proteína alvo foi normalizado pela coloração de ponceau respectiva e os resultados expressos em unidades arbitrárias.

### **5.3 Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados pelo software Prism (GraphPad Softwares Inc., San Diego, USA).

Os valores serão apresentados a seguir como média  $\pm$  desvio padrão.

Os valores encontrados foram analisados em três etapas. Na primeira etapa, testou-se o efeito da empagliflozina no diabetes mellitus e para tal, foram comparados os dados dos grupos CTL, DM, DM+EMPA3 e DM+EMPA10. Na segunda etapa, foi testado o efeito da empagliflozina sobre o infarto agudo do miocárdio, comparando-se os dados dos grupos CTL, IAM, IAM+EMPA3 e IAM+EMPA10. Na terceira parte, foi testado o efeito da empagliflozina no infarto agudo do miocárdio em animais diabético, comparando-se os dados dos grupos CTL, DM+IAM, DM+IAM+EMPA3, DM+IAM+EMPA10. Em todos os casos, foi avaliada a distribuição dos dados quanto a sua normalidade através do teste Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição normal foram comparado pelo teste de ANOVA 1 via com teste de post-hoc de Tukey, enquanto que, os dados com

distribuição anormal foram avaliados pelo teste Kruskal-Wallis com teste de post-hoc de Dunn's.

Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significantes.

## 6 Resultados

### 6.1 Efeitos da Empagliflozina sobre o Diabetes Mellitus

#### 6.1.1 Avaliação metabólica

##### 6.1.1.1 Peso Corporal

No início do protocolo o peso dos animais dos grupos CTL, DM, DM + EMPA3 e DM + EMPA10 foi semelhante (figura 1). Após a indução do diabetes pela STZ, não houve redução de peso significativa nos grupos estudados em relação ao peso inicial no protocolo, assim como não houve diferença entre os grupos na avaliação pré tratamento (figura 2). Contudo, na avaliação ao final do tratamento, houve redução significativa do peso dos animais diabéticos, independentemente de tratamento, em relação ao grupo controle (figura 3).

(Tabela 1)

Tabela 1 – Peso dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10) nos momentos: início do protocolo, pré tratamento e após tratamento (final do protocolo)

		Inicial	Pré tratamento	Final
<b>Peso (gramas)</b>	<b>CTL</b>	275,7 ± 23,5	275,7 ± 23,5	292,6 ± 22,7
	<b>DM</b>	294,3 ± 21,4	269,8 ± 21,6	253,0 ± 21,1 <sup>a</sup>
	<b>DM+EMPA3</b>	296,9 ± 21,9	275,4 ± 24,4	261,0 ± 26,7 <sup>a</sup>
	<b>DM+EMPA10</b>	284,0 ± 14,0	263,3 ± 11,1	246,5 ± 9,4 <sup>a</sup>

Valores expressos em média ± DPM; a: p<0,05 vs CTL

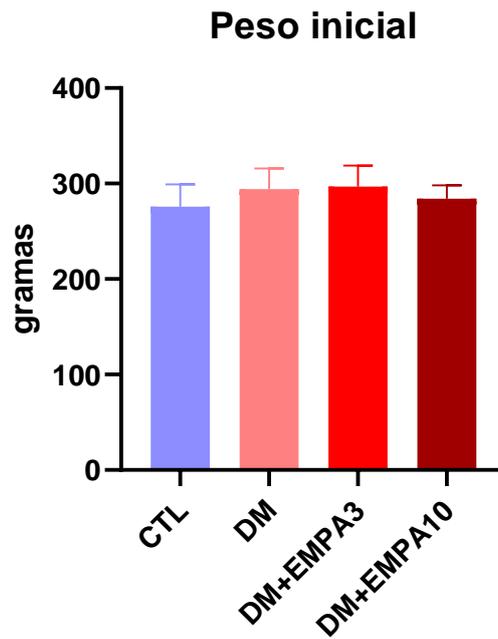


Figura 1: Peso dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10), no momento inicial do protocolo

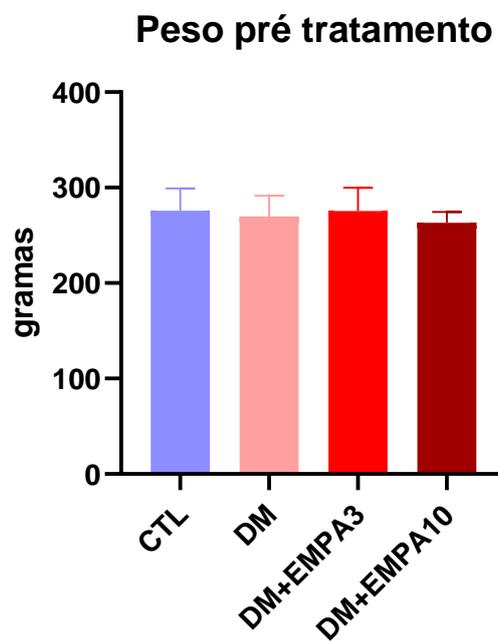


Figura 2: Peso dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10), no momento pré tratamento

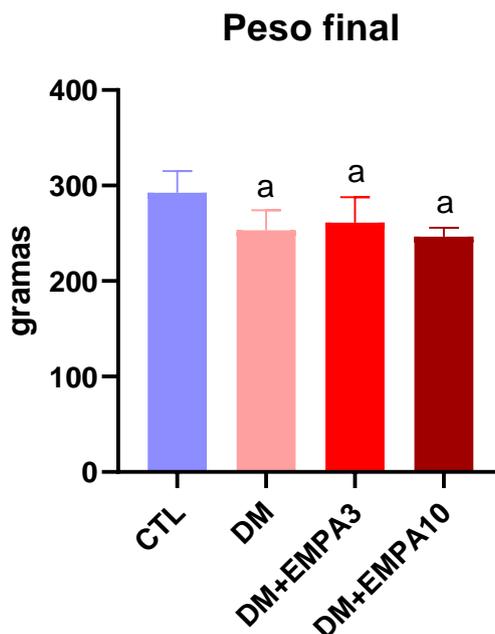


Figura 3: Peso dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10), no momento final do protocolo. a:  $p < 0,05$  vs CTL

### 6.1.1.2 Glicemia

No tempo inicial do protocolo, não houve diferença significativa nos valores de glicemia nos animais dos grupos estudados (figura 4). Contudo, confirmando a eficácia da indução do diabetes pela STZ, houve aumento significativo da glicemia nos animais dos grupos DM, DM + EMPA3 e DM + EMPA10, em relação ao grupo CTL (figura 5). O mesmo comportamento pode ser observado no período pós tratamento, não havendo diferença de glicemia entre os animais dos grupos DM e DM+EMPA3, porém, o tratamento com empagliflozina na dose de 10 mg/kg, foi capaz de reduzir a glicemia em relação ao grupo DM. (figura 6 e tabela 2).

Tabela 2 – Glicemia dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10), nos momentos: início do protocolo, pré tratamento e após tratamento (final do protocolo)

		Inicial	Pré tratamento	Pós tratamento
<b>Glicose</b> (mg/dL)	<b>CTL</b>	105,6 ± 19,5	105,6 ± 19,5	106,1 ± 13,6
	<b>DM</b>	105,1 ± 16,8	389,8 ± 60,0 <sup>a</sup>	381,9 ± 28,0 <sup>a</sup>
	<b>DM+EMPA3</b>	103,4 ± 17,7	401,3 ± 24,6 <sup>a</sup>	360,1 ± 38,5 <sup>a</sup>
	<b>DM+EMPA10</b>	107,5 ± 23,9	389,5 ± 27,3 <sup>a</sup>	318,1 ± 50,3 <sup>ab</sup>

Valores expressos em média ± DPM; a p<0,05 vs CTL; b p<0,05 vs DM

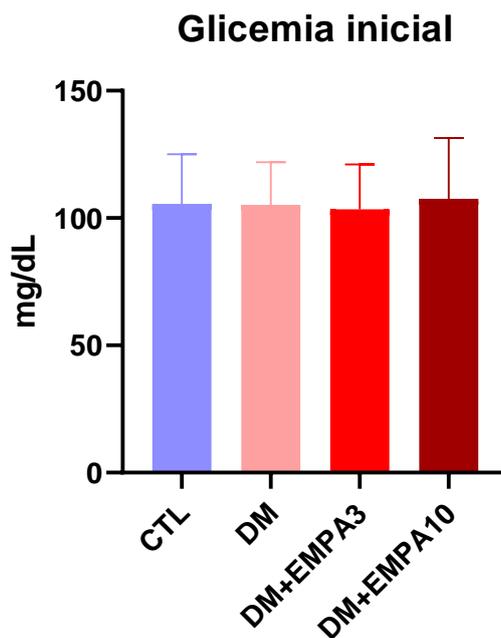


Figura 4: Glicemia dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10), no momento inicial do protocolo

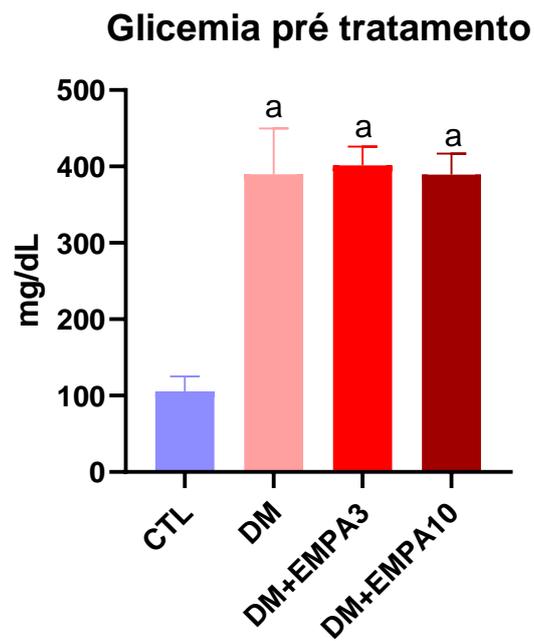


Figura 5: Glicemia dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10), no momento pré tratamento. a:  $p < 0,05$  vs CTL

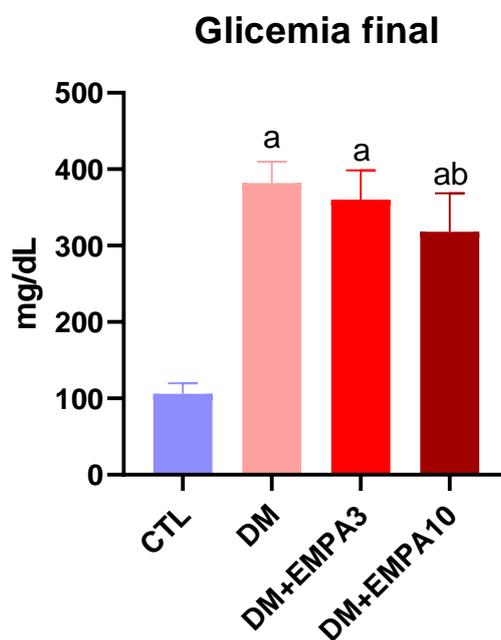


Figura 6: Glicemia dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10), no final do protocolo. a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM

### 6.1.1.3 Triglicerídeos

Os valores de triglicerídeos apresentaram-se de forma semelhante no início do protocolo entre os grupos estudados (figura 7). Após a indução do diabetes, houve aumento significativo dos triglicerídeos apenas no grupo DM em relação ao grupo CTL (figura 8). Ao final do protocolo, houve aumento dos triglicérides nos grupos diabéticos, independente de tratamento, em relação ao grupo controle. (figura 9 e tabela 3)

Tabela 3 – Triglicerídeos dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10), nos momentos: início do protocolo, pré tratamento e após tratamento (final do protocolo)

		Inicial	Pré tratamento	Pós tratamento
Triglicerídeos (mg/dL)	CTL	104,7 ± 26,7	104,7 ± 26,7	106,0 ± 23,8
	DM	126,8 ± 33,0	153,3 ± 41,3 <sup>a</sup>	194,6 ± 29,7 <sup>a</sup>
	DM+EMPA3	95,8 ± 10,8	120,5 ± 18,4	196,9 ± 33,3 <sup>a</sup>
	DM+EMPA10	106,1 ± 22,2	143,8 ± 34,8	221,3 ± 48,2 <sup>a</sup>

Valores expressos em média ± DPM; a p<0,05 vs CTL

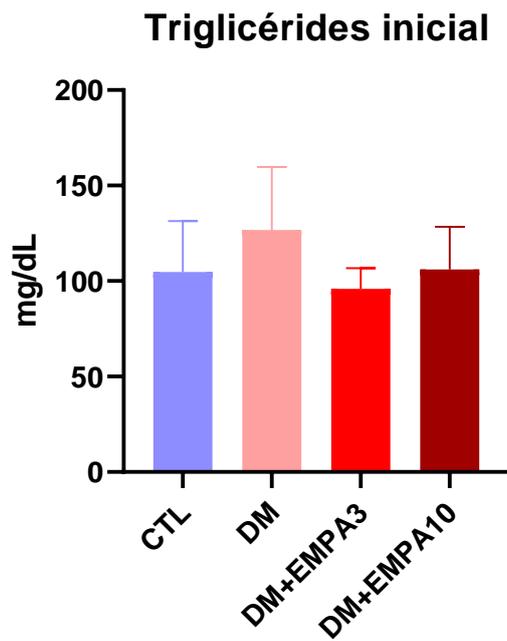


Figura 7: Triglicérides dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10), no início do protocolo.

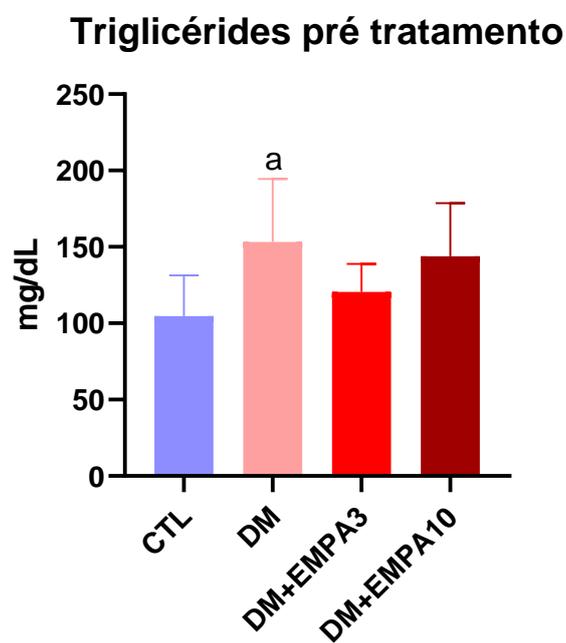


Figura 8: Triglicérides dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10), no momento pré tratamento. a:  $p < 0,05$  vs CTL

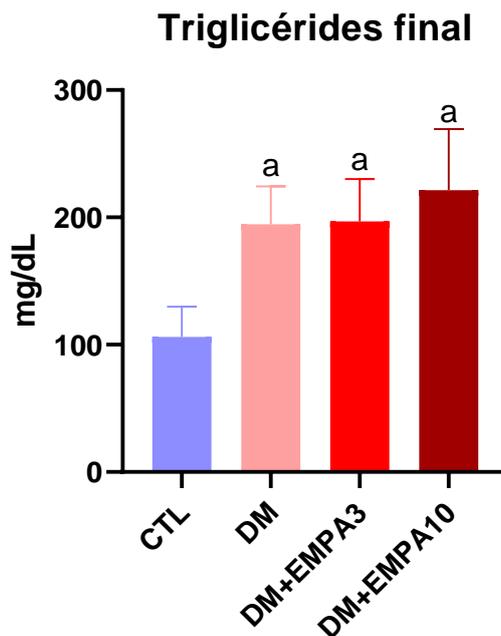


Figura 9: Triglicérides dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10), no momento final do protocolo. a:  $p < 0,05$  vs CTL

## 6.1.2 Avaliação hemodinâmica

### 6.1.2.1 Pressão arterial sistólica (PAS)

Ao final do protocolo, houve redução nos valores de pressão arterial sistólica entre os animais dos grupos DM ( $111,8 \pm 7,3$  mmHg), DM + EMPA 3 ( $123,4 \pm 12,5$  mmHg) e DM + EMPA 10 ( $119,8 \pm 10,6$  mmHg) em relação ao grupo CTL ( $136,4 \pm 5,9$  mmHg) (Figura 10).

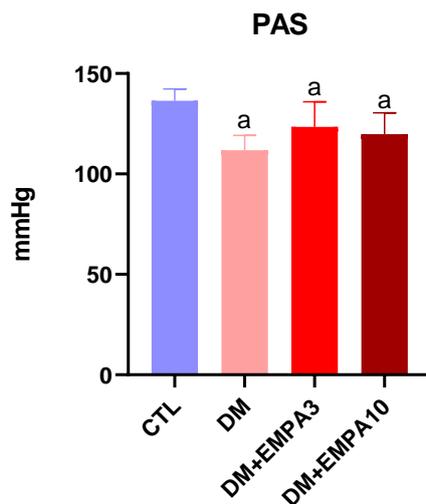


Figura 10: Pressão arterial sistólica dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10); a p<0,05 vs CTL

### 6.1.2.2 Pressão arterial diastólica (PAD)

Para os valores de pressão arterial diastólica, houve diferença estatística significativa apenas entre os animais dos grupos CTL e DM (PAD: CTL  $92,95 \pm 5,7$ ; DM:  $80,38 \pm 6,4$ ; DM+EMPA3:  $88,75 \pm 8,3$ ; DM+EMPA10:  $86,25 \pm 6,47$  mmHg) (Figura 11).

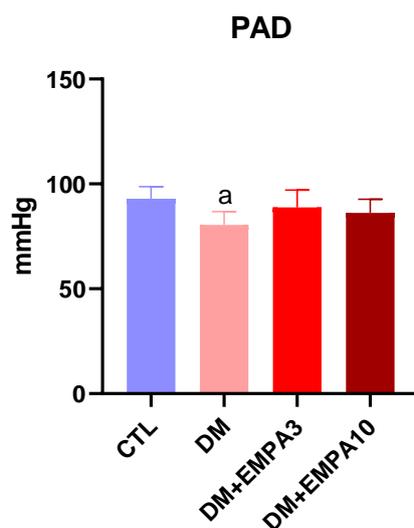


Figura 11: Pressão arterial diastólica dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10); a p<0,05 vs CTL

### 6.1.2.3 Pressão arterial média (PAM)

Em relação a pressão arterial média, houve diferença significativa entre os animais dos grupos DM e DM+EMPA10 comparados ao grupo CTL. (PAM: CTL  $112,1 \pm 5,9$ ; DM:  $95,67 \pm 7,2$ ; DM+EMPA3:  $10,54 \pm 10,14$ ; DM+EMPA10:  $102,2 \pm 7,1$  mmHg). (Figura 12).

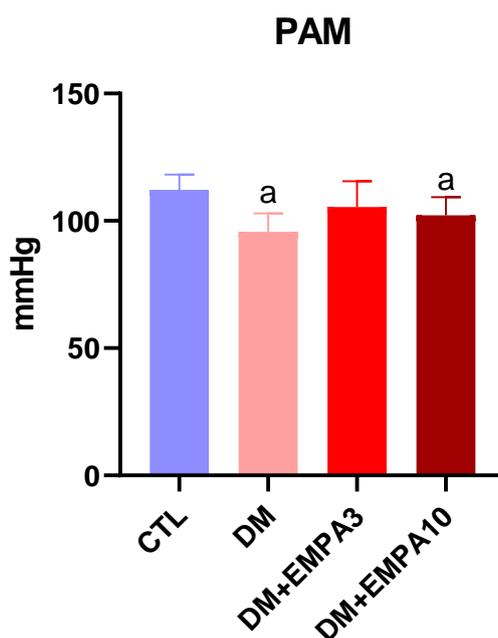


Figura 12: Pressão arterial média dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10); a  $p < 0,05$  vs CTL

### 6.1.2.4 Pressão de pulso

A pressão de pulso, apresentou-se reduzida nos animais dos grupos diabéticos, independentemente do tratamento (DM, DM+EMPA3 e DM+EMPA10) quando comparada ao grupo CTL. (Pressão de pulso: CTL:  $43,50 \pm 2,30$ ; DM:  $31,39 \pm 2,78$ ; DM+EMPA3:  $34,70 \pm 5,86$ ; DM+EMPA10:  $33,54 \pm 8,63$  mmHg). (Figura 13).

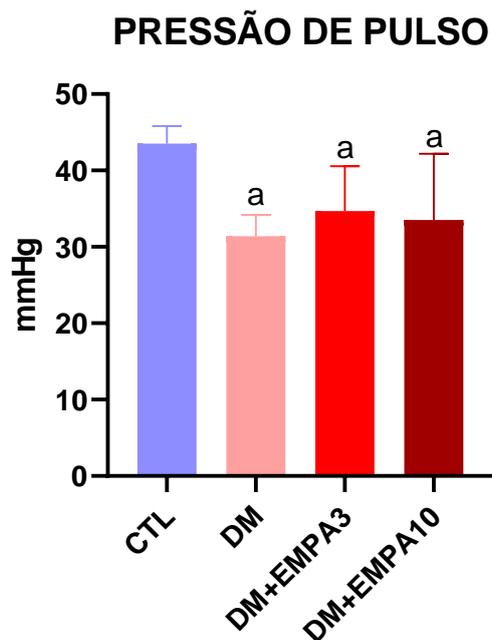


Figura 13: Pressão de pulso dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10); a  $p < 0,05$  vs CTL

#### 6.1.2.5 Frequência cardíaca média (FCM)

Observou-se redução da frequência cardíaca média no grupo DM em relação ao grupo CTL.

Houve ainda, normalização da FC nos grupos tratados (DM+EMPA3 e DM+EMPA10). Adicionalmente, houve aumento da FC no grupo DM+EMPA10 em relação ao grupo DM. (FC: CTL  $350,5 \pm 24,6$ ; DM:  $257,9 \pm 20,82$ ; DM+EMPA3:  $297,2 \pm 30,7$ ; DM+EMPA10:  $317,4 \pm 45,8$  mmHg). (Figura 14)

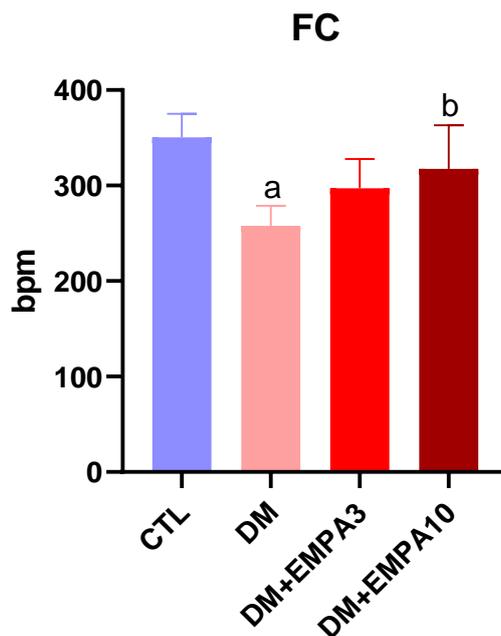


Figura 14: Frequência cardíaca média dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA 3 (n=10) e DM+EMPA 10 (n=10); a  $p < 0,05$  vs CTL; b  $p < 0,05$  vs DM

#### 6.1.2.6 Resposta bradicárdica

Houve diferença significativa nos índices de bradicardia reflexa entre os animais dos grupos DM e CTL.

O tratamento com empagliflozina foi capaz de manter os valores da resposta reflexa dos grupos tratados na mesma faixa do grupo CTL, sendo esta melhora ainda mais evidente no grupo DM+EMPA10, que ainda apresentou diferença dos valores em relação ao grupo DM. (Bradicardia reflexa: CTL  $-1,43 \pm 0,24$ ; DM:  $-0,69 \pm 0,11$ ; DM+EMPA3:  $-1,11 \pm 0,37$ ; DM+EMPA10:  $-1,48 \pm 0,24$  bpm/mmHg) (Figura 15)

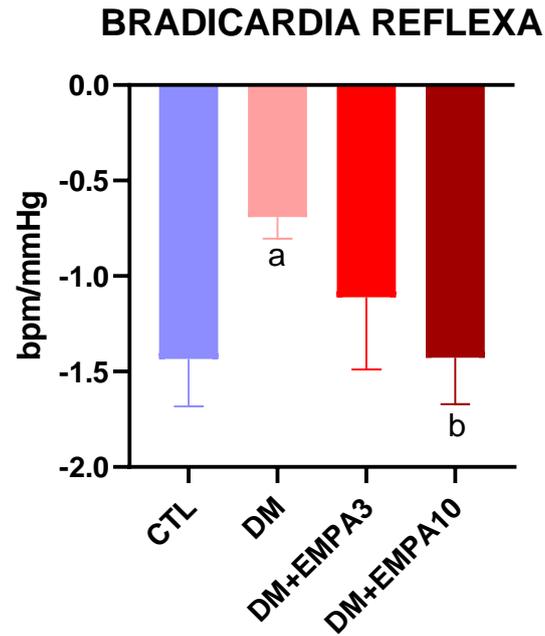


Figura 15: Resposta bradicárdica dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10); a  $p < 0,05$  vs CTL; b  $p < 0,05$  vs DM

#### 6.1.2.7 Resposta taquicárdica

Em relação a resposta taquicárdica, nota-se aumento do índice no grupo DM+EMPA3 em relação aos grupos CTL e DM. (Resposta taquicárdica: CTL  $3,256 \pm 0,68$ ; DM:  $3,244 \pm 0,91$  mmHg; DM+EMPA3:  $4,859 \pm 1,49$ ; DM+EMPA10:  $4,200 \pm 0,81$  bpm/mmHg) (Figura 16)

## TAQUICARDIA REFLEXA

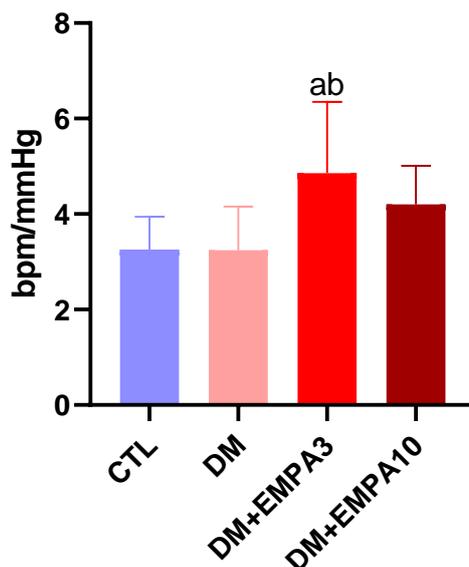


Figura 16: Resposta taquicárdica dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10); a  $p < 0,05$  vs CTL; b  $p < 0,05$  vs DM

### 6.1.2.8 Sensibilidade barorreflexa espontânea

Para os índices analisados e relacionados à sensibilidade barorreflexa espontânea, não houve diferenças significantes entre os grupos, conforme tabela 4.

Tabela 4: Índices do método da sequência dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10)

	CTL	DM	DM+EMPA3	DM+EMPA10
<b>BEI down (ms/mmHg)</b>	0,1191 ± 0,05	0,0889 ± 0,05	0,1026 ± 0,04	0,0984 ± 0,04
<b>BEI up (ms/mmHg)</b>	0,0941 ± 0,05	0,1245 ± 0,08	0,0838 ± 0,04	0,0942 ± 0,03
<b>BEI all (ms/mmHg)</b>	0,1028 ± 0,05	0,1101 ± 0,06	0,0924 ± 0,04	0,0908 ± 0,03
<b>BGI down (ms/mmHg)</b>	4,526 ± 1,63	3,101 ± 0,67	4,187 ± 3,74	3,492 ± 2,05
<b>BGI up (ms/mmHg)</b>	2,625 ± 1,09	3,199 ± 1,58	2,763 ± 1,27	2,366 ± 1,31
<b>BGI all (ms/mmHg)</b>	3,547 ± 0,83	3,350 ± 1,48	3,401 ± 2,10	2,616 ± 1,24

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros do método da sequência. BEI down (ms/mmHg): índice de eficiência barorreflexa para rampas de descida; BEI up (ms/mmHg): índice de eficiência barorreflexa para rampas de subida; BEI all (ms/mmHg): índice de eficiência barorreflexa para rampas absolutas; BGI down: índice de ganho barorreflexo para rampas de descida; BGI up: índice de ganho barorreflexo para rampas de subida; BGI all: índice de ganho barorreflexo para rampas absolutas.

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

Os índices utilizados na avaliação da variabilidade da frequência cardíaca não apresentaram diferenças significantes entre os grupos CTL, DM, DM+EMPA3 e DM+EMPA10, conforme Tabela 5.

Tabela 5: Índices de variabilidade da frequência cardíaca dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10)

	CTL	DM	DM+EMPA3	DM+EMPA10
<b>DP IP (ms)</b>	6,872 ± 1,31	7,051 ± 1,98	8,040 ± 4,11	7,003 ± 3,47
<b>Var IP (ms<sup>2</sup>)</b>	48,78 ± 18,91	53,29 ± 30,47	78,18 ± 79,46	59,89 ± 55,83
<b>RMSSD (ms)</b>	4,883 ± 0,68	7,813 ± 2,84	6,692 ± 3,68	7,066 ± 2,91
<b>LF IP (ms<sup>2</sup>)</b>	2,677 ± 1,20	5,312 ± 4,17	3,572 ± 2,08	2,720 ± 2,10
<b>HF IP (ms<sup>2</sup>)</b>	6,580 ± 1,87	15,660 ± 11,68	13,21 ± 15,40	15,18 ± 11,80
<b>Power total (ms<sup>2</sup>)</b>	26,80 ± 10,21	40,89 ± 27,63	30,69 ± 22,00	31,53 ± 21,70
<b>LF (nu)</b>	26,57 ± 11,08	25,63 ± 12,11	26,99 ± 12,18	20,63 ± 14,48
<b>HF (nu)</b>	73,43 ± 11,08	74,37 ± 12,11	73,01 ± 12,18	79,38 ± 14,48
<b>LF/HF</b>	0,3903 ± 0,21	0,3799 ± 0,24	0,4043 ± 0,26	0,3065 ± 0,28
<b>0V (%)</b>	36,96 ± 11,54	27,34 ± 9,19	38,13 ± 14,44	31,56 ± 18,81
<b>1V (%)</b>	36,24 ± 4,91	37,04 ± 2,62	33,25 ± 6,92	36,92 ± 4,53
<b>2V (%)</b>	26,97 ± 7,43	35,62 ± 8,68	28,65 ± 12,29	33,90 ± 13,35

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

### 6.1.2.10 Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica

Em relação a análise da variabilidade da pressão arterial sistólica, entre os parâmetros analisados e apresentados na tabela 6, houve apenas diferença significativa na modulação de baixa frequência da pressão arterial sistólica entre os grupos CTL e DM, demonstrando que o tratamento, independente da dose,

foi capaz de manter a modulação simpática na variabilidade da pressão arterial sistólica, que não diferiu mais do grupo controle (figura 17).

Tabela 6: Índices de variabilidade da pressão arterial sistólica dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10)

	CTL	DM	DM+EMPA3	DM+EMPA10
<b>DP PAS (mmHg)</b>	4,114 ± 0,99	3,048 ± 0,92	3,810 ± 1,67	3,109 ± 0,55
<b>Var PAS (mmHg<sup>2</sup>)</b>	17,82 ± 7,68	10,05 ± 6,44	16,85 ± 12,47	9,941 ± 3,30
<b>LF PAS (mmHg<sup>2</sup>)</b>	3,579 ± 2,18	1,327 ± 2,38 <sup>a</sup>	2,382 ± 1,23	2,286 ± 1,01

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

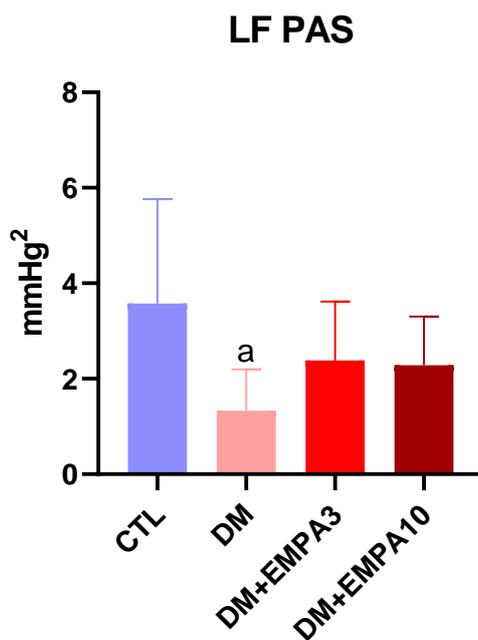


Figura 17: Modulação de baixa frequência da pressão arterial sistólica dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10); a p<0,05 vs CTL

### 6.1.3 Avaliação ecocardiográfica

#### 6.1.3.1 Parâmetros morfométricos

Encontram-se apresentados na tabela 7 os parâmetros ecocardiográficos morfométricos.

Notou-se apenas redução do diâmetro do átrio esquerdo no grupo DM+EMPA10 em relação ao grupo DM.

Tabela 7: Parâmetros ecocardiográficos morfométricos dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10)

	CTL	DM	DM+EMPA3	DM+EMPA10
<b>Aorta (mm)</b>	3,264 ± 0,28	3,301 ± 0,35	3,335 ± 0,41	3,276 ± 0,37
<b>Átrio esquerdo (mm)</b>	4,211 ± 0,53	4,350 ± 0,42	3,949 ± 0,52	3,753 ± 0,32 <sup>b</sup>
<b>PLVEd (mm)</b>	1,282 ± 0,29	1,176 ± 0,20	1,208 ± 0,21	1,213 ± 0,17
<b>SIVd (mm)</b>	1,060 ± 0,21	0,934 ± 0,12	0,933 ± 0,14	0,960 ± 0,10
<b>DDVEd (mm)</b>	6,687 ± 0,98	7,321 ± 0,95	7,481 ± 0,60	7,115 ± 0,46
<b>DDVEs (mm)</b>	3,821 ± 1,14	4,692 ± 0,95	5,420 ± 0,67	5,374 ± 0,57

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros de ecocardiográficos morfométricos; PLVEd: espessura diastólica parede livre do ventrículo esquerdo; SIVDd: espessura diastólica do septo interventricular; DDVEd: diâmetro diastólico da cavidade do ventrículo esquerdo; DDVEs: diâmetro sistólico da cavidade do ventrículo esquerdo; a: p< 0,05 vs CTL; b: p<0,05 vs DM

#### 6.1.3.2 Parâmetros de função sistólica

Encontram-se apresentados na tabela 8 os parâmetros ecocardiográficos relacionados a função sistólica do ventrículo esquerdo.

Tabela 8: Parâmetros ecocardiográficos relacionados a função sistólica do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10)

	CTL	DM	DM+EMPA3	DM+EMPA10
<b>FE VE (%)</b>	77,09 ± 8,1	64,84 ± 10,7 <sup>a</sup>	54,53 ± 6,36 <sup>ab</sup>	64,81 ± 8,4 <sup>ac</sup>
<b>FEnc VE (%)</b>	46,33 ± 10,7	37,22 ± 8,5 <sup>a</sup>	31,56 ± 4,6 <sup>a</sup>	37,41 ± 4,7 <sup>a</sup>

<b>FAC (%)</b>	61,18 ± 5,7	43,46 ± 4,6	41,85 ± 7,7	42,67 ± 5,1
<b>FE VE long (%)</b>	50,91 ± 8,8	49,99 ± 9,4	48,81 ± 6,7	46,18 ± 9,7
<b>S' (mm/s)</b>	47,79 ± 5,9	43,42 ± 3,7	44,79 ± 5,23	44,08 ± 5,1

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros ecocardiográficos relacionados a função sistólico do ventrículo esquerdo; FE VE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo calculada pelo modo M em eixo curto; FEnc VE: fração de encurtamento do ventrículo esquerdo; FAC: mudança fracional da área da cavidade do ventrículo esquerdo; FE VE long: fração de ejeção do ventrículo esquerdo calculado pelo modo bidimensional em corte do eixo longo; S': velocidade de movimentação sistólica das fibras miocárdicas longitudinais; a: p<0,05 vs CTL; b: p<0,05 vs DM; c: p<0,05 vs DM+EMPA3

Em relação a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, se observou redução nos grupos diabéticos independentemente de tratamento, contudo as ambas as doses foram capaz de atenuar tal redução, porém o tratamento com a dose de 10 mg/kg foi mais eficaz nesta atenuação (figura 18). Ainda, se observa redução da fração de encurtamento em todos os grupos diabéticos em relação ao grupo controle.

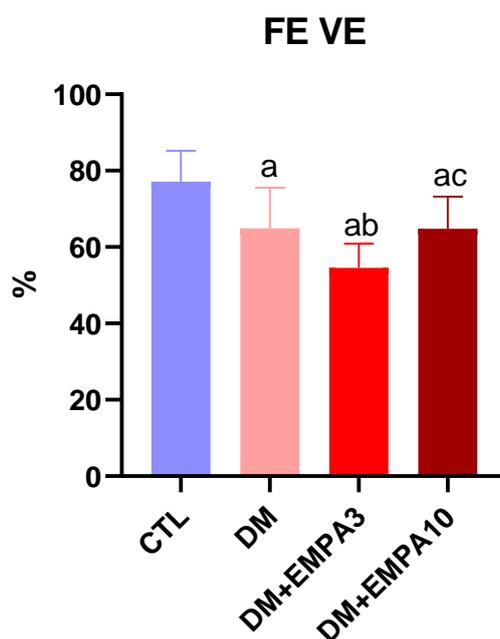


Figura 18: Fração de ejeção do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10); a p<0,05 vs CTL; b: p<0,05 vs DM; c: p<0,05 vs DM+EMPA3

### 6.1.3.3 Parâmetros de função diastólica

Encontram-se apresentados na tabela 9 os parâmetros ecocardiográficos relacionados a função diastólica do ventrículo esquerdo.

Tabela 9: Parâmetros ecocardiográficos relacionados a função diastólica do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10)

	CTL	DM	DM+EMPA3	DM+EMPA10
<b>Vel. Máx. E (mm/s)</b>	1092 ± 116,5	770 ± 133,4 <sup>a</sup>	825,4 ± 182,4 <sup>a</sup>	895,3 ± 106,8 <sup>a</sup>
<b>Vel. Máx. A (mm/s)</b>	598,1 ± 103,1	564 ± 151,5	585,8 ± 126,5	639,1 ± 106,4
<b>E/A</b>	1,862 ± 0,21	1,465 ± 0,5 <sup>4a</sup>	1,426 ± 0,25 <sup>a</sup>	1,449 ± 0,37 <sup>a</sup>
<b>Vel. Máx. E' (mm/s)</b>	45,02 ± 7,9	33,31 ± 8,4	44,79 ± 15,4	50,36 ± 14,8 <sup>b</sup>
<b>Vel. Máx. A' (mm/s)</b>	55,34 ± 19,9	57,82 ± 12,0	49,03 ± 18,0	45,16 ± 8,9
<b>E'/A'</b>	0,982 ± 0,5	0,514 ± 0,1	1,062 ± 0,6	1,307 ± 0,4 <sup>b</sup>
<b>TRIV (ms)</b>	17,62 ± 4,0	21,47 ± 5,3	17,66 ± 5,4	19,99 ± 4,8
<b>E/E'</b>	25,05 ± 4,8	24,58 ± 7,4	19,67 ± 5,7	23,39 ± 5,3

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros ecocardiográficos relacionados a função diastólica do ventrículo esquerdo; Vel. Máx. E: velocidade máxima da onda E do fluxo mitral; Vel. Máx. A: velocidade máxima da onda A do fluxo mitral; E/A: relação entre as ondas E e A; Vel. Máx. E': velocidade máxima da onda E' da movimentação miocárdica; Vel. Máx. A': velocidade máxima da onda A' da movimentação miocárdica; E'/A': relação entre as ondas E' e A'; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; E/E': relação entre as ondas E e E'; a: p<0,05 vs CTL; b: p<0,05 vs DM

Podemos notar uma redução da velocidade máxima da onda E e da relação E/A em todos os grupos diabéticos em relação ao grupo controle, não havendo diferença significantes nestes parâmetros nos grupos tratados (figura 19)

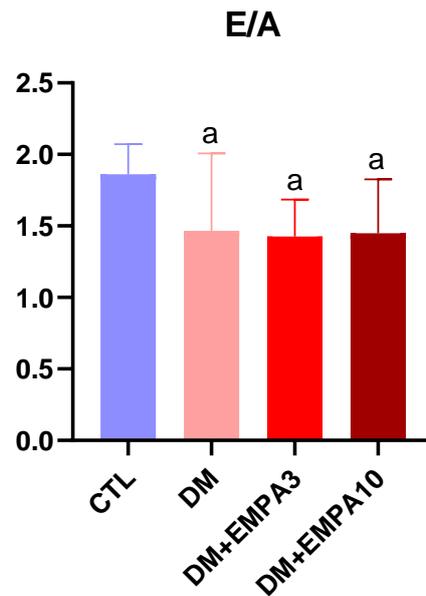


Figura 19: Relação E/A do fluxo mitral dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10);  
a  $p < 0,05$  vs CTL

Ainda, notamos aumento da relação E'/A' nos animais tratados com a dose de 10 mg/kg em relação ao grupo diabético (figura 20)

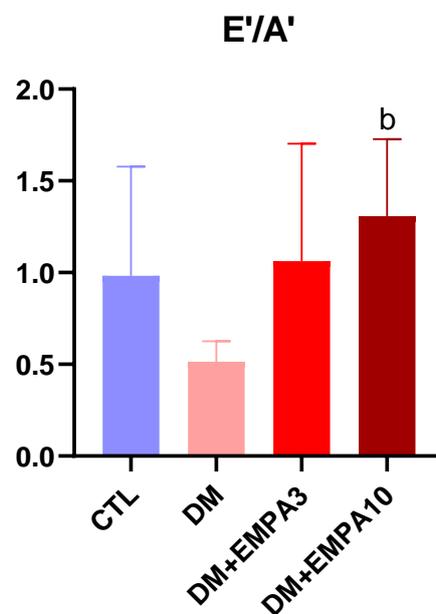


Figura 20: Relação E'/A' dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10);  
b  $p < 0,05$  vs DM

### 6.1.4 Quantificação do colágeno em tecido cardíaco

As áreas totais dos ventrículos esquerdos e direitos não apresentaram diferença entre os grupos estudados. (Tabela 10)

Contudo, houve redução da porcentagem de colágeno total nos ventrículos esquerdo e direito no grupo DM em relação ao grupo controle. Adicionalmente, notou-se redução da porcentagem de colágeno no ventrículo direito (figura 23) nos grupos diabéticos tratados com ambas as doses de empagliflozina quando comparados ao grupo controle. (Tabela 10 e figuras 21 e 22)

Tabela 10: Avaliação histológica dos ventrículos esquerdo e direito dos animais dos grupos CTL (n=6), DM (n=6), DM+EMPA3 (n=6) e DM+EMPA10 (n=6)

	CTL	DM	DM+EMPA3	DM+EMPA10
<b>Área total do VE (mm<sup>2</sup>)</b>	62,89 ± 16,2	64,66 ± 11,6	66,88 ± 6,2	63,76 ± 9,4
<b>% colágeno VE</b>	0,5089 ± 0,1	0,2019 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,1871 ± 0,2	0,2834 ± 0,1
<b>% colágeno VE/mm<sup>2</sup></b>	0,3262 ± 12,4	0,1354 ± 8,4	0,1238 ± 11,9	0,1827 ± 13,7
<b>Área total VD</b>	7,43 ± 1,5	12,29 ± 3,2	10,20 ± 0,3	11,34 ± 3,9
<b>% colágeno VD</b>	0,9764 ± 0,2	0,4509 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,3583 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,4157 ± 0,1 <sup>a</sup>

Tabela representativa das médias ± desvio padrão; a: p<0,05 vs CTL

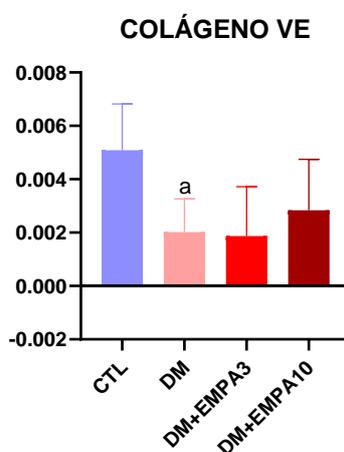


Figura 21: Colágeno total do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM (n=6), DM+EMPA3 (n=6) e DM+EMPA10 (n=6); a: p<0,05 vs CTL

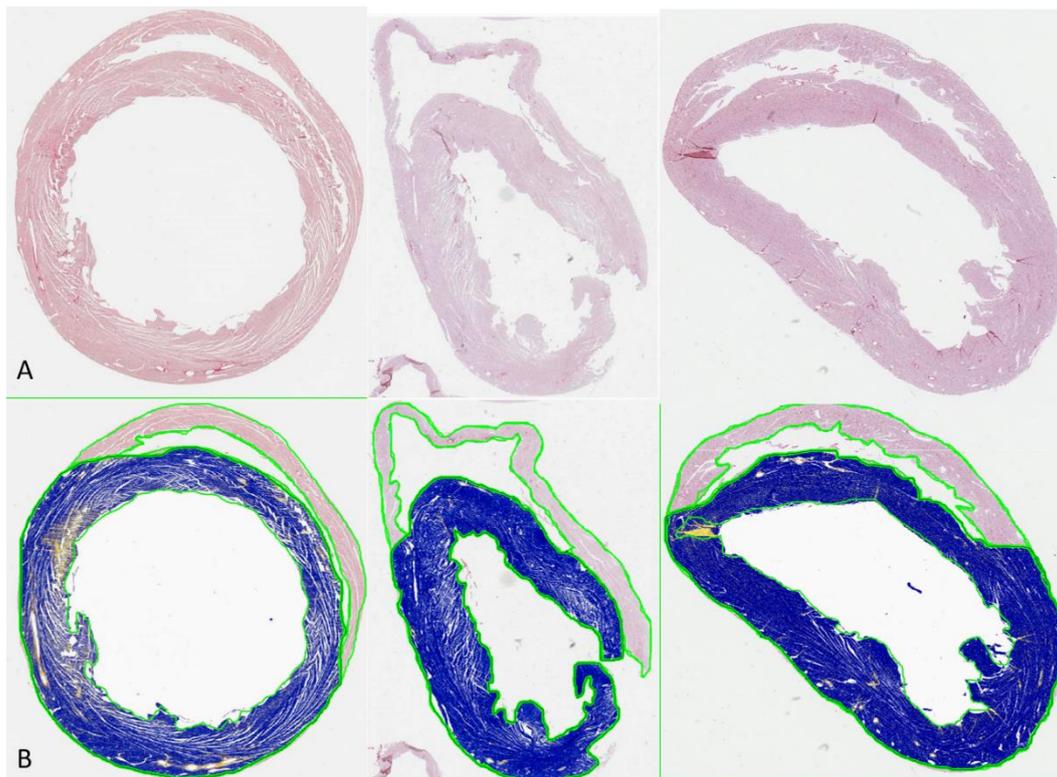


Figura 22: Figura representativa dos cortes histológicos na linha A e das áreas totais de tecido ventricular esquerdo (azul) e colágeno (amarelo) na linha B, respectivamente nos grupos CTL, DM e DM+EMPA10

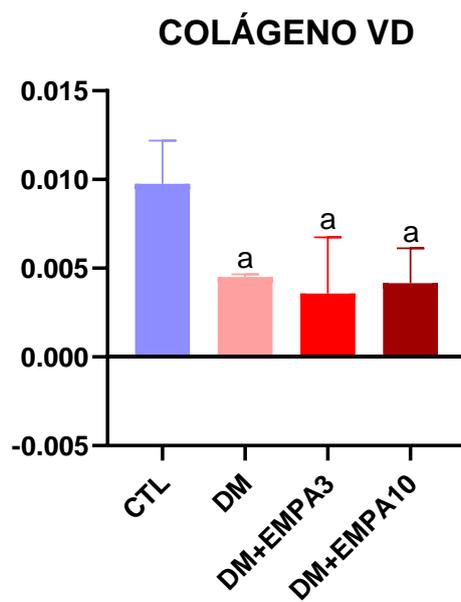


Figura 23: Colágeno total do ventrículo direito dos animais dos grupos CTL (n=6), DM (n=6), DM+EMPA3 (n=6) e DM+EMPA10 (n=6); a  $p < 0,05$  vs CTL

## 6.1.5 Expressão de proteínas cardíacas

### 6.1.5.1 Expressão de proteínas envolvidas na regulação intracelular do cálcio

Em relação as proteínas fosfolambam e fosfolambam fosforilada, não se observou diferença entre os grupos estudados, contudo, nota-se redução da relação fosfolambam fosforilada / fosfolambam nos grupos DM e DM+EMPA10 em relação ao grupo CTL e ainda, aumento desta relação no grupo DM+EMPA10 quando comparado ao grupo DM (Tabela 11 e figura 24).

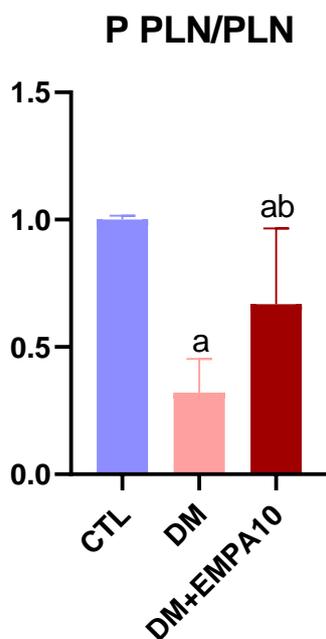


Figura 24: Relação fosfolambam fosforilada/fosfolambam total dos animais dos grupos CTL (n=6), DM (n=6) e DM+EMPA10 (n=6); a  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM

Em relação a SERCA2 e relação SERCA2/fosfolambam, não se observou diferença entre os grupos estudados (Tabela 11).

Tabela 11: Expressão de proteínas envolvidas na recaptação de Ca<sup>2+</sup> pelo retículo sarcoplasmático do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM (n=6) e DM+EMPA10 (n=6)

	CTL	DM	DM+EMPA10
<b>PLN</b>	1,000 ± 0,50	2,646 ± 1,20	2,816 ± 1,675
<b>P PLN</b>	0,999 ± 0,49	0,8721 ± 0,50	1,622 ± 0,66
<b>P PLN/PLN</b>	1,000 ± 0,01	0,3211 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,6685 ± 0,29 <sup>ab</sup>
<b>SERCA2</b>	2,677 ± 1,20	5,312 ± 4,17	2,720 ± 2,10
<b>SERCA2/PLN</b>	1,228 ± 0,59	0,5967 ± 0,23	0,6745 ± 0,34

Tabela representativa das médias ± desvio padrão das proteínas envolvida na recaptação de Ca<sup>2+</sup> - expressas em unidades de medida arbitrárias. PLN: fosfolambam; P PLN: fosfolambam fosforilado total; P PLN/PLN: relação fosfolambam fosforilado total / fosfolambam; SERCA2: ; SERCA2/PLN: relação SERCA2/fosfolambam; a: p<0,05 vs CTL; b: p<0,05 vs DM

### 6.1.5.2 Expressão de proteínas de matriz extracelular

Em relação as proteínas de matriz extracelular, pode-se observar aumento da ERK 1 e 2 total nos grupos diabéticos independente do tratamento (figura 25).

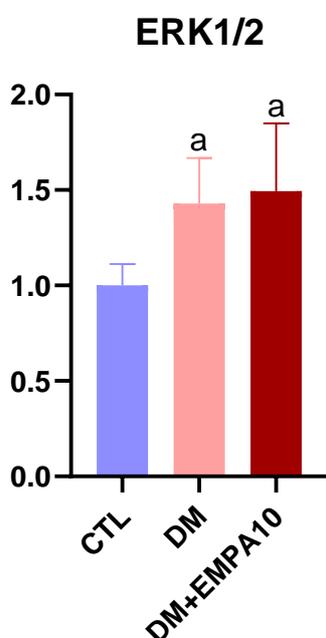


Figura 25: Expressão da ERK1/2 total do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM (n=6) e DM+EMPA10 (n=6); a p<0,05 vs CTL

Ainda, notou-se aumento da ERK 1/2 fosforilada e da relação ERK 1/2 fosforilada/ERK 1/2 total, no grupo diabético e tratado com empagliflozina em relação aos grupos controle e diabético (Imagens 26 e 27).

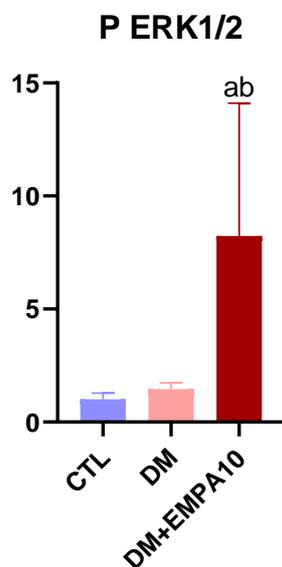


Figura 26: Expressão da ERK1/2 fosforilada do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM (n=6) e DM+EMPA10 (n=6); a  $p < 0,05$  vs CTL; b  $p < 0,05$  vs DM

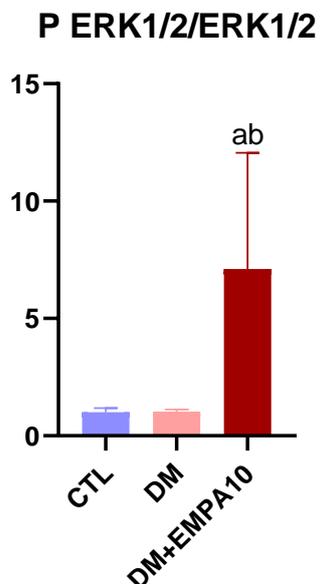


Figura 27: Relação ERK1/2 fosforilada/ERK1/2 total do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM (n=6) e DM+EMPA10 (n=6); a  $p < 0,05$  vs CTL; b  $p < 0,05$  vs DM

### 6.1.6 Estresse oxidativo

Estão apresentadas na tabela 12 as medidas de estresse oxidativo dos grupos CTL, DM e DM+EMPA10.

Tabela 12: Parâmetros de estresse oxidativo do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM (n=6) e DM+EMPA10 (n=6)

	CTL	DM	DM+EMPA10
<b>Carbonilas</b>	8,610 ± 1,08	9,063 ± 1,98	10,030 ± 3,47
<b>Peróxido</b>	2,882 ± 0,37	2,498 ± 0,38	2,720 ± 0,22
<b>NADPH oxidase</b>	0,2050 ± 0,03	0,2088 ± 0,05	0,1893 ± 0,01
<b>CAT</b>	0,9717 ± 0,17	1,086 ± 0,41	2,240 ± 0,81 <sup>ab</sup>
<b>SOD</b>	13,94 ± 0,91	16,89 ± 1,73 <sup>a</sup>	16,08 ± 2,69
<b>FRAP</b>	0,6716 ± 0,14	0,3968 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,6700 ± 0,15 <sup>b</sup>
<b>Nitrito</b>	1,594 ± 0,54	1,757 ± 0,31	1,588 ± 0,21

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros de estresse oxidativo; a: p<0,05 vs CTL; b: p<0,05 vs DM

Em relação a CAT, notou-se um aumento no grupo diabético e tratado com empagliflozina em relação ao grupo CTL e ao grupo DM (Figura 28).

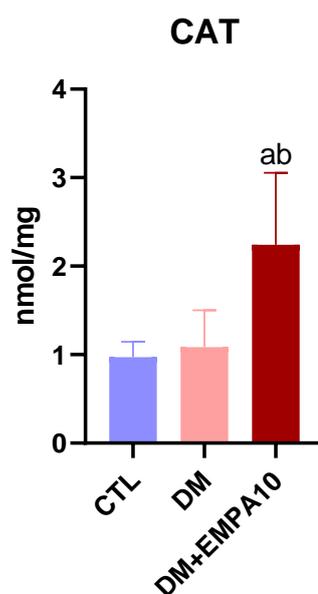


Figura 28: Expressão da enzima antioxidante catalase no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM (n=6) e DM+EMPA10 (n=6); a p<0,05 vs CTL; b p<0,05 vs DM

A SOD apresentou-se aumentada no grupo DM quando comparada com o grupo CTL. A empagliflozina parece ter atenuado esse aumento. (Figura 29).

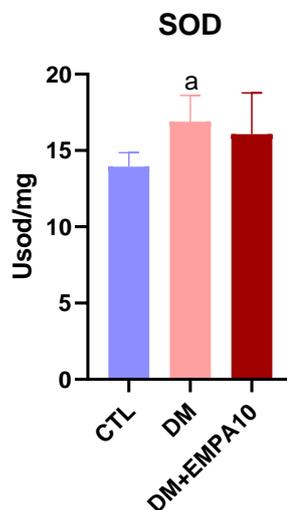


Figura 29: Expressão da enzima superóxido dismutase do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM (n=6) e DM+EMPA10 (n=6); a  $p < 0,05$  vs CTL

A FRAP apresentou-se reduzida no grupo DM quando comparada ao grupo controle, e ainda, aumentada no grupo DM+EMPA10 em relação ao grupo DM (Figura 30).

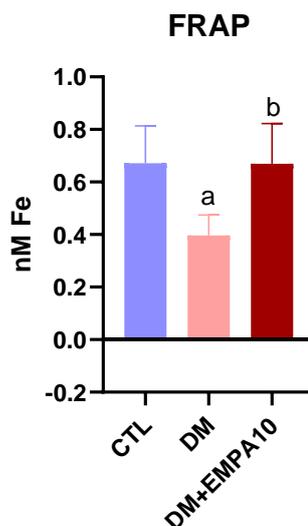


Figura 30: Expressão da capacidade de redução de ferro do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM (n=6) e DM+EMPA10 (n=6); a  $p < 0,05$  vs CTL; b  $p < 0,05$  vs DM

## 6.2 Efeitos da Empagliflozina sobre o infarto agudo do miocárdio

### 6.2.1 Avaliação metabólica

#### 6.2.1.1 Peso Corporal

No início do protocolo o peso dos animais dos grupos CTL, IAM, IAM+EMPA3 e IAM+EMPA10 foi semelhante (figura 31). Ao final do protocolo, houve redução do peso dos animais infartados, porém, com diferença significativa apenas entre os grupos IAM e IAM+EMPA3, em relação ao grupo controle. (Figura 32 e Tabela 13).

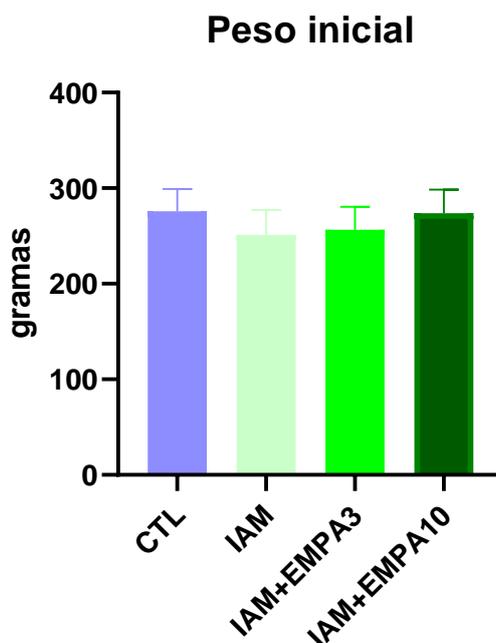


Figura 31: Peso dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10) no momento inicial do protocolo

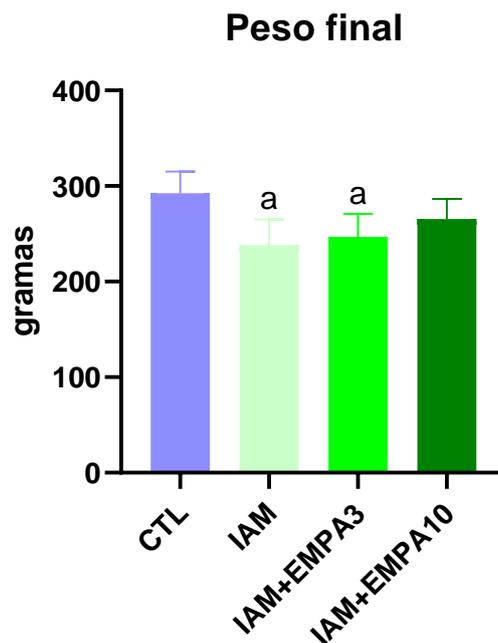


Figura 32: Peso dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10) no momento final do protocolo; a:  $p < 0,05$  vs CTL

Tabela 13 – Peso dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10) nos momentos: início do protocolo, pré tratamento e após tratamento (final do protocolo)

		Inicial	Pós tratamento
<b>Peso (gramas)</b>	<b>CTL</b>	275,7 ± 23,5	292,6 ± 22,7
	<b>IAM</b>	251,0 ± 26,0	238,3 ± 26,8 <sup>a</sup>
	<b>IAM+EMPA3</b>	256,6 ± 23,8	246,9 ± 23,9 <sup>a</sup>
	<b>IAM+EMPA10</b>	273,8 ± 24,7	265,5 ± 21,6

Valores expressos em média ± DPM; a  $p < 0,05$  vs CTL

### 6.2.1.2 Glicemia

Ao início do protocolo e ao seu final, não houve diferença significativa nos valores de glicemia nos animais dos grupos estudados. (Figuras 33 e 34 e Tabela 14).

Tabela 14 – Glicemia dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10), nos momentos: início do protocolo, pré tratamento e após tratamento (final do protocolo)

		Inicial	Pós tratamento
<b>Glicose (mg/dL)</b>	<b>CTL</b>	105,6 ± 19,5	106,1 ± 13,6
	<b>IAM</b>	103,6 ± 14,2	98,2 ± 10,8
	<b>IAM+EMPA3</b>	105,5 ± 16,8	99,2 ± 10,0
	<b>IAM+EMPA10</b>	104,4 ± 18,2	101,8 ± 8,5

Valores expressos em média ± DPM

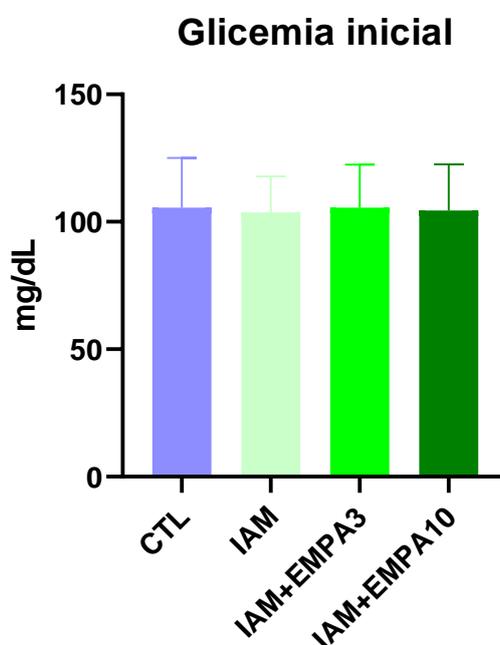


Figura 33: Glicemia dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10) no momento inicial do protocolo

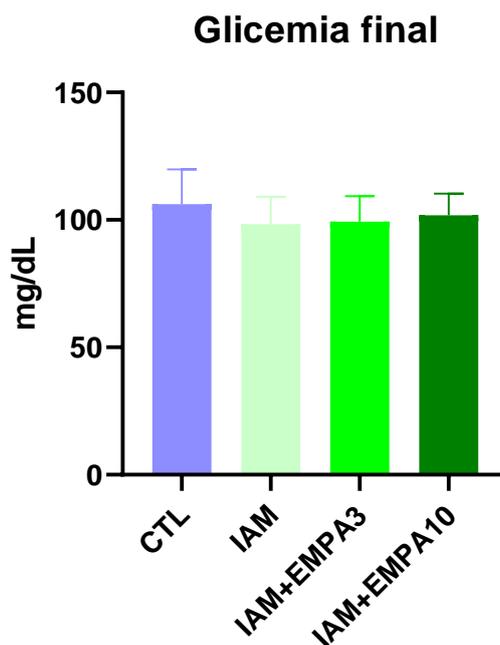


Figura 34: Glicemia dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10) no momento final do protocolo

### 6.2.1.3 Triglicerídeos

Ao início do protocolo e ao seu final, não houve diferença significativa nos valores de triglicérides nos animais dos grupos estudados. (Figuras 35 e 36 e Tabela 15).

Tabela 15 – Triglicerídeos dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10), nos momentos: início do protocolo, pré tratamento e após tratamento (final do protocolo)

		Inicial	Pós tratamento
<b>Triglicérides</b> (mg/dL)	<b>CTL</b>	104,7 ± 26,7	106,0 ± 23,8
	<b>IAM</b>	115,5 ± 31,0	118,8 ± 23,9
	<b>IAM+EMPA3</b>	95,6 ± 9,3	104,3 ± 18,6
	<b>IAM+EMPA10</b>	106,3 ± 34,2	108,5 ± 15,9

Valores expressos em média ± DPM

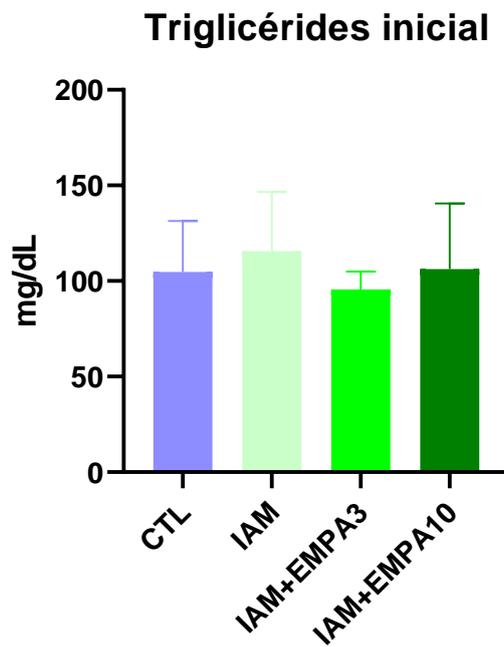


Figura 35: Triglicérides dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10) no momento inicial do protocolo

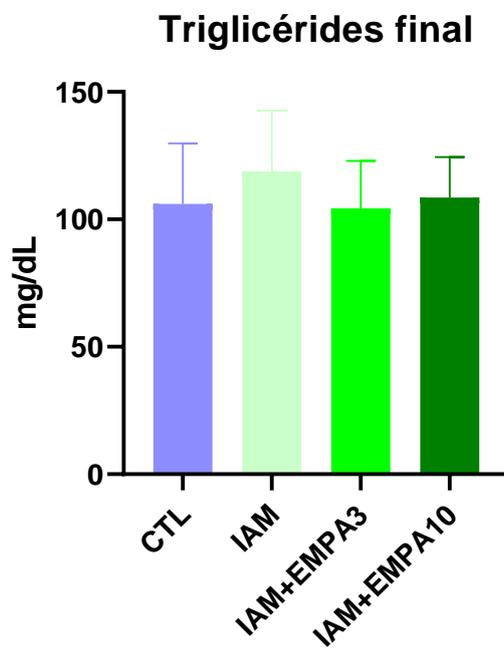


Figura 36: Triglicérides dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10) no momento final do protocolo

## 6.2.2 Avaliação hemodinâmica

### 6.2.2.1 Pressão arterial sistólica (PAS)

Ao final do protocolo, houve redução nos valores de pressão arterial sistólica entre os animais do grupo IAM ( $117,6 \pm 8,99$  mmHg) em relação ao grupo CTL ( $136,4 \pm 5,92$  mmHg), contudo o tratamento com empagliflozina, independentemente da dose utilizada, foi capaz de manter a pressão arterial nos níveis do grupo controle (IAM+EMPA 3 ( $132,4 \pm 9,54$  mmHg) e IAM+EMPA 10 ( $129,8 \pm 4,28$  mmHg) (Figura 37).

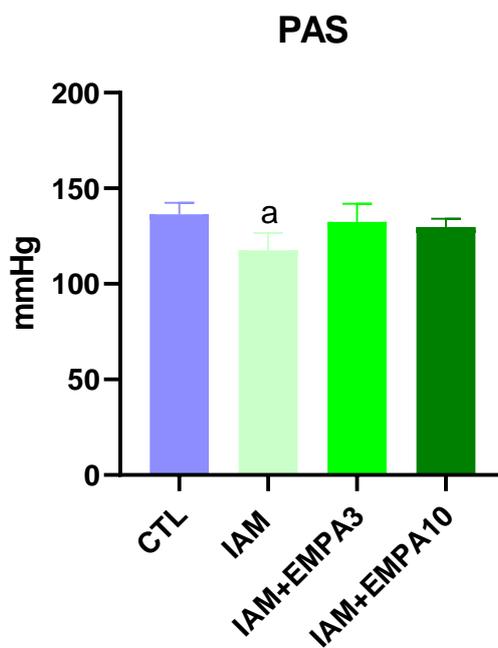


Figura 37: Pressão arterial sistólica dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA 3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL

### 6.2.2.2 Pressão arterial diastólica (PAD)

Para os valores de pressão arterial diastólica, houve diferença estatística significativa apenas entre os animais dos grupos CTL e IAM+EMPA10. (PAD: CTL  $92,95 \pm 5,70$ ; IAM:  $88,21 \pm 6,38$ ; IAM+EMPA3:  $90,23 \pm 4,38$ ; IAM+EMPA10:  $85,83 \pm 5,16$  mmHg) (Figura 38).

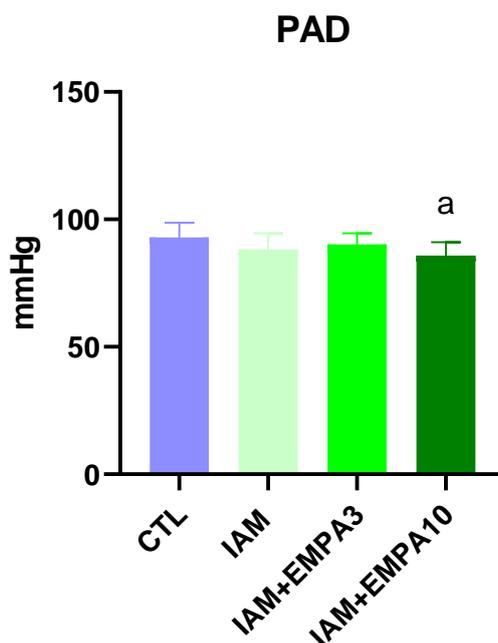


Figura 38: Pressão arterial diastólica dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL

### 6.2.2.3 Pressão arterial média (PAM)

Em relação a pressão arterial média, houve redução significativa entre os animais dos grupos IAM em relação ao grupo CTL. Ainda, o tratamento com empagliflozina na dose de 3 mg/kg, foi capaz de reestabelecer os valores de PAM ao níveis do grupo CTL. (PAM: CTL  $112,1 \pm 5,98$ ; IAM:  $101,3 \pm 7,29$ ; IAM+EMPA3:  $110,1 \pm 7,72$ ; IAM+EMPA10:  $104,4 \pm 6,90$  mmHg). (Figura 39).

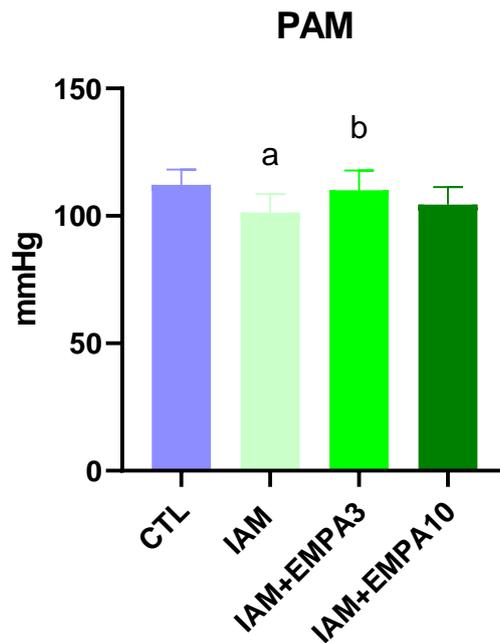


Figura 39: Pressão arterial média dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs IAM

#### 6.2.2.4 Pressão de pulso

A pressão de pulso, apresentou-se reduzida nos animais do grupo infartado, quando comparada ao grupo CTL. Contudo o tratamento com empagliflozina independentemente da dose utilizada no tratamento, foi capaz de elevar as pressões da pulso, ao nível do grupo CTL. (Pressão de pulso: CTL:  $43,50 \pm 2,30$ ; IAM:  $29,63 \pm 6,26$ ; IAM+EMPA3:  $40,30 \pm 4,00$ ; IAM+EMPA10:  $41,25 \pm 5,54$  mmHg). (Figura 40).

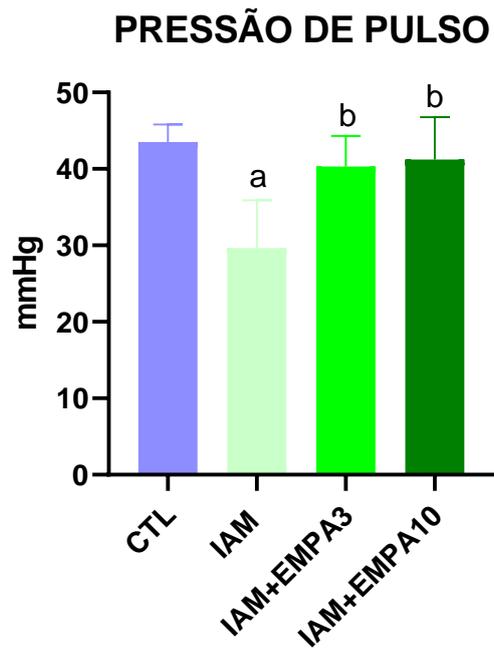


Figura 40: Pressão de pulso dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs IAM

#### 6.2.2.5 Frequência cardíaca média (FCM)

Não se observou redução da frequência cardíaca média entre os grupos CTL, IAM, IMA+EMPA3 e IAM+EMPA10. (Frequência cardíaca média: CTL:  $350,5 \pm 24,65$ ; IAM:  $398,5 \pm 55,74$ ; IAM+EMPA3:  $355,1 \pm 30,81$ ; IAM+EMPA10:  $357,3 \pm 25,70$  bpm). (Figura 41).

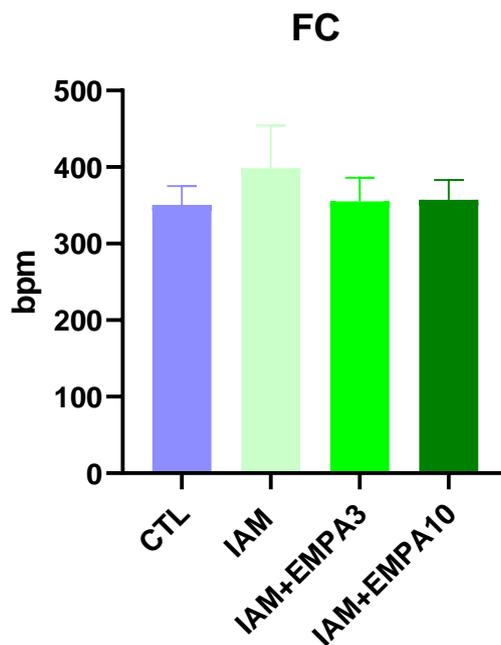


Figura 41: Frequência cardíaca média dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA 3 (n=10) e IAM+EMPA 10 (n=10)

#### 6.2.2.6 Resposta bradicárdica

Houve redução significativa nos índices de bradicardia reflexa nos animais do grupo infartado (IAM), quando comparada ao grupo controle (CTL). Contudo o tratamento com empagliflozina independentemente da dose utilizada no tratamento, foi capaz de elevar as respostas, ao nível do grupo CTL. (Bradicardia reflexa: CTL:  $-1,43 \pm 0,24$ ; IAM:  $-0,69 \pm 0,16$ ; IAM+EMPA3:  $-1,36 \pm 0,26$ ; IAM+EMPA10:  $-1,54 \pm 0,23$  bpm/mmHg) (Figura 42)

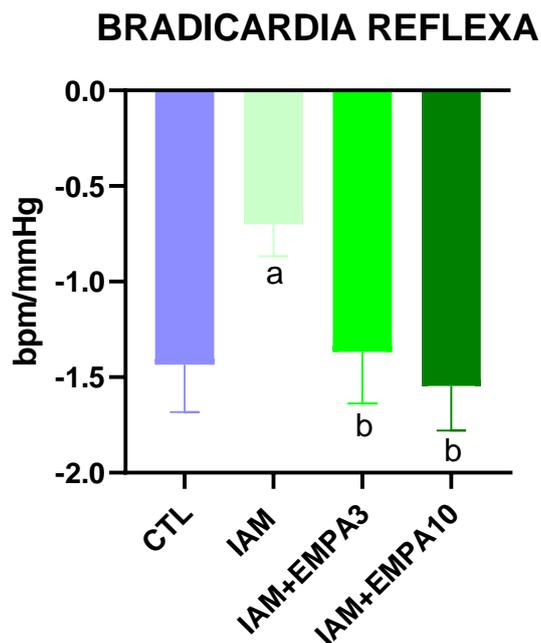


Figura 42: Resposta bradicárdica dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs IAM

### 6.2.2.7 Resposta taquicárdica

Houve redução significativa nos índices de taquicardia reflexa nos animais do grupo infartado (IAM), quando comparada ao grupo controle (CTL). Contudo o tratamento com empagliflozina independentemente da dose utilizada no tratamento, foi capaz de preservar as respostas taquicárdicas.

Adicionalmente, nota-se a resposta taquicárdica aumentada no grupo IAM+EMPA10 em relação aos grupos CTL, IAM e IAM+EMPA3 (Taquicardia reflexa: CTL:  $3,25 \pm 0,68$ ; IAM:  $1,82 \pm 0,21$ ; IAM+EMPA3:  $3,24 \pm 0,72$ ; IAM+EMPA10:  $4,95 \pm 0,37$  bpm/mmHg) (Figura 43)

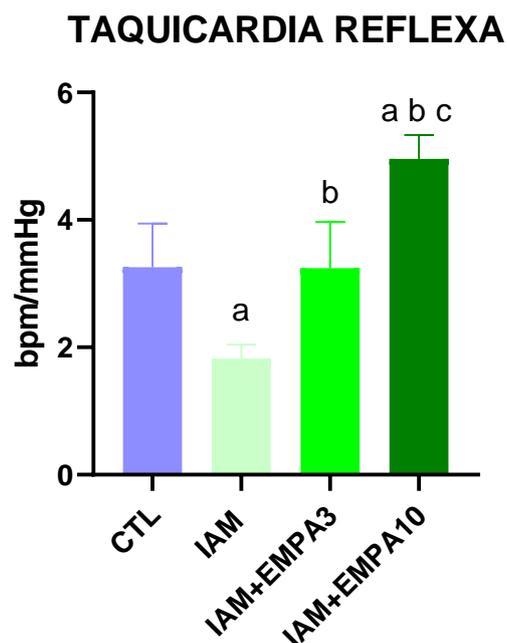


Figura 43: Resposta taquicárdica dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10);  
a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs IAM; c:  $p < 0,05$  vs IAM+EMPA3

### 6.2.2.8 Sensibilidade barorreflexa espontânea

Para os índices analisados relacionados a sensibilidade barorreflexa espontânea, houve apenas redução significativa do índice de ganho barorreflexo para rampas absolutas (BGI all) no grupo IAM e CTL (figura 44). Contudo, não foram observadas diferenças nos demais parâmetros entre os grupos, conforme tabela 16.

Tabela 16: Índices do método da sequência dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10)

	CTL	IAM	IAM+EMPA3	IAM+EMPA10
<b>BEI down (ms/mmHg)</b>	0,1191 ± 0,05	0,1326 ± 0,06	0,0668 ± 0,04	0,1328 ± 0,09
<b>BEI up (ms/mmHg)</b>	0,0941 ± 0,05	0,1113 ± 0,07	0,1013 ± 0,10	0,2126 ± 0,20
<b>BEI all (ms/mmHg)</b>	0,1028 ± 0,05	0,1031 ± 0,06	0,0856 ± 0,07	0,1742 ± 0,14
<b>BGI down (ms/mmHg)</b>	4,526 ± 1,63	3,020 ± 1,57	2,687 ± 1,42	2,815 ± 1,45
<b>BGI up (ms/mmHg)</b>	2,625 ± 1,09	1,681 ± 0,71	2,312 ± 1,53	1,911 ± 0,61
<b>BGI all (ms/mmHg)</b>	3,547 ± 0,83	2,114 ± 0,71 <sup>a</sup>	2,544 ± 1,145	2,544 ± 1,00

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros do método da sequência. BEI down (ms/mmHg): índice de eficiência barorreflexa para rampas de descida; BEI up (ms/mmHg): índice de eficiência barorreflexa para rampas de subida; BEI all (ms/mmHg):

índice de eficiência barorreflexa para rampas absolutas; BGI down: índice de ganho barorreflexo para rampas de descida; BGI up: índice de ganho barorreflexo para rampas de subida; BGI all: índice de ganho barorreflexo para rampas absolutas.  $p < 0,05$  vs CTL

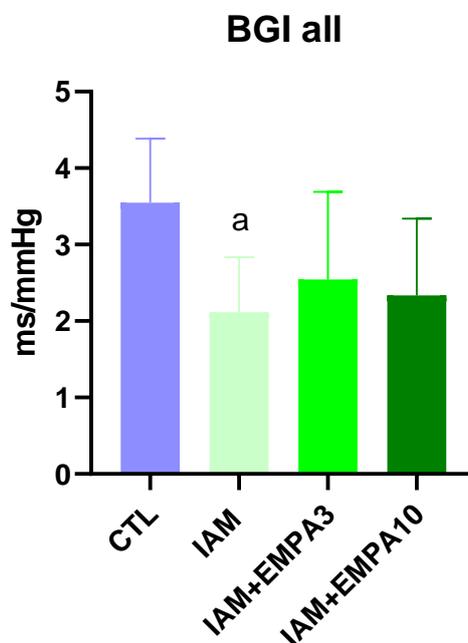


Figura 44: Índice de ganho barorreflexo para rampas absolutas dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL

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

Os índices utilizados na avaliação da variabilidade da frequência cardíaca estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17: Índices de variabilidade da frequência cardíaca dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10)

	CTL	IAM	IAM+EMPA3	IAM+EMPA10
<b>DP IP (ms)</b>	6,872 ± 1,31	5,413 ± 1,31	7,741 ± 2,52	8,050 ± 2,38 <sup>b</sup>
<b>Var IP (ms<sup>2</sup>)</b>	48,78 ± 18,91	28,09 ± 11,04	65,50 ± 46,46	69,88 ± 43,13
<b>RMSSD (ms)</b>	4,883 ± 0,68	5,999 ± 2,66	6,666 ± 2,23	6,224 ± 2,37
<b>LF IP (ms<sup>2</sup>)</b>	2,677 ± 1,20	1,326 ± 1,03	3,248 ± 3,41	3,663 ± 3,07
<b>HF IP (ms<sup>2</sup>)</b>	6,580 ± 1,87	7,750 ± 5,16	10,280 ± 5,69	8,194 ± 4,12
<b>Power total (ms<sup>2</sup>)</b>	26,80 ± 10,21	17,48 ± 8,94	30,82 ± 25,66	42,58 ± 29,14 <sup>b</sup>
<b>LF (nu)</b>	26,57 ± 11,08	12,70 ± 7,36 <sup>a</sup>	15,82 ± 9,56	22,08 ± 11,30
<b>HF (nu)</b>	73,43 ± 11,08	87,30 ± 7,36 <sup>a</sup>	84,19 ± 9,56	77,92 ± 11,30
<b>LF/HF</b>	0,3903 ± 0,21	0,1531 ± 0,10	0,2038 ± 0,14	0,3078 ± 0,19

<b>0V (%)</b>	36,96 ± 11,54	38,65 ± 15,18	28,63 ± 9,33	39,36 ± 10,57
<b>1V (%)</b>	36,24 ± 4,91	33,66 ± 6,72	40,19 ± 3,94	37,61 ± 8,82
<b>2V (%)</b>	26,97 ± 7,43	28,56 ± 8,98	31,94 ± 8,31	23,02 ± 4,30

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

Notou-se aumento do power total no grupo IAM+EMPA10 em relação ao grupo IAM (figura 45)

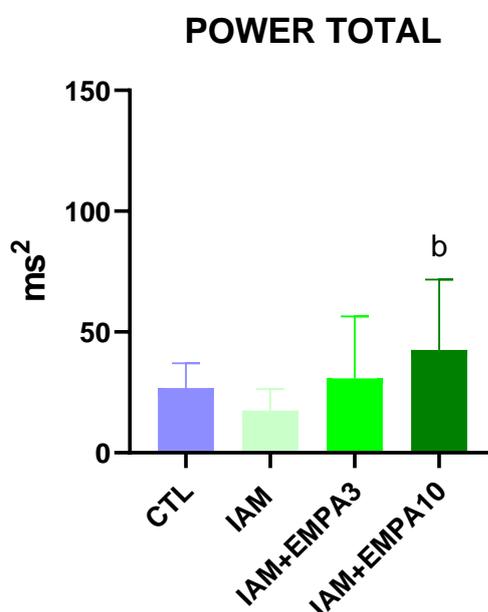


Figura 45: Potência total do sinal dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10); b: p<0,05 vs IAM

No grupo IAM, foi observado uma redução da modulação de baixa frequência do intervalo de pulso normalizada (LF IP), assim como uma elevação da modulação de alta frequência do intervalo de pulso normalizada (HF IP), quando comparado ao grupo controle. Ainda, o tratamento com empagliflozina, independentemente da dose, foi capaz de normalizar os parâmetros citados (Figuras 46 e 47).

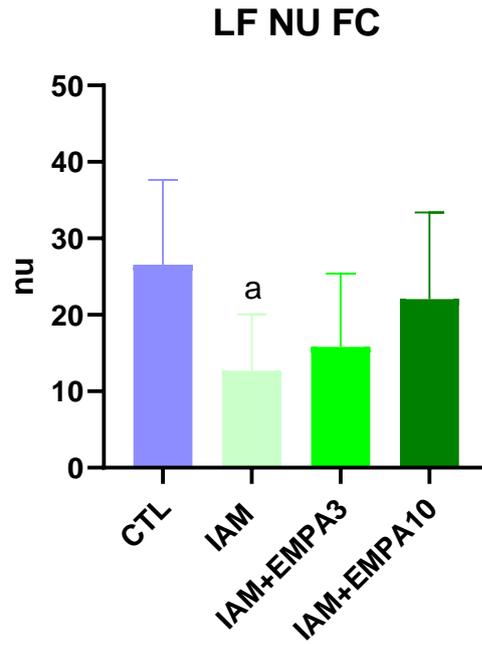


Figura 46: Modulação de baixa frequência do intervalo de pulso dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL

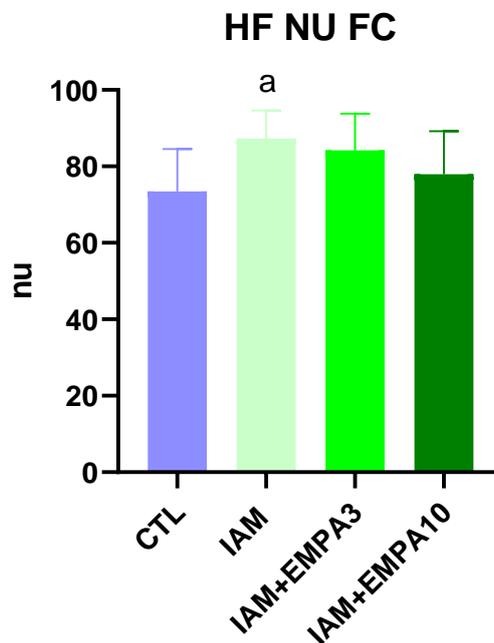


Figura 47: Modulação de alta frequência do intervalo de pulso dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL

### 6.2.2.10 Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica

Em relação a análise da variabilidade da pressão arterial sistólica, não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros avaliados e descritos na tabela 18.

Tabela 18: Índices de variabilidade da pressão arterial sistólica dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10)

	CTL	IAM	IAM+EMPA3	IAM+EMPA10
<b>DP PAS (mmHg)</b>	4,114 ± 0,99	3,318 ± 1,23	4,266 ± 1,23	4,583 ± 1,57
<b>Var PAS (mmHg<sup>2</sup>)</b>	17,82 ± 7,68	19,64 ± 10,69	19,53 ± 11,42	23,19 ± 15,20
<b>LF PAS (mmHg<sup>2</sup>)</b>	3,579 ± 2,18	2,916 ± 2,29	3,326 ± 1,51	4,083 ± 2,32

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

### 6.2.3 Avaliação ecocardiográfica

#### 6.2.3.1 Parâmetros morfométricos

Encontram-se apresentados na tabela 19 os parâmetros ecocardiográficos morfométricos.

Notou-se redução do diâmetro do átrio esquerdo no grupo IAM+EMPA10 em relação ao grupo IAM.

Conforme esperado pela ligadura da artéria coronária e isquemia miocárdica, notou-se redução da espessura do septo interventricular na diástole e do diâmetro diastólico nos grupos IAM e IAM+EMPA3 em relação ao grupo controle, contudo, os animais do grupo IAM+EMPA10 apresentaram atenuação desta redução (figura 48).

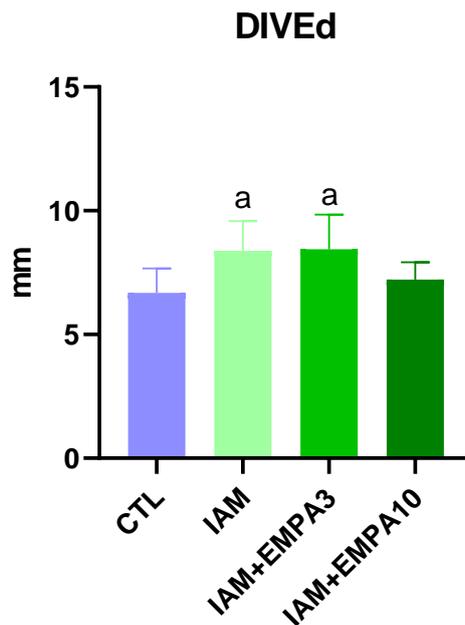


Figura 48: Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL

Ainda, notou-se aumento do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo nos grupos IAM e IAM+EMPA3 em relação ao grupo controle, porém, os animais do grupo IAM+EMPA10 sofreram importante atenuação deste aumento, sendo os valores menores do que aqueles dos grupos IAM e IAM+EMPA3 (figura 49)

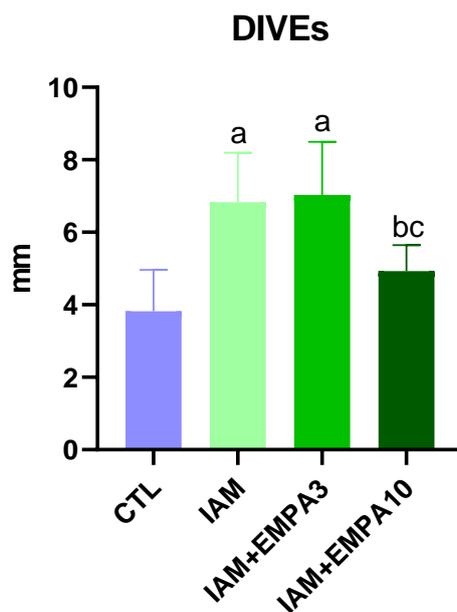


Figura 49: Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL

Tabela 19: Parâmetros ecocardiográficos morfométricas dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10)

	CTL	IAM	IAM+EMPA3	IAM+EMPA10
<b>Aorta (mm)</b>	3,264 ± 0,28	3,628 ± 0,28	3,339 ± 0,44	3,239 ± 0,37
<b>Átrio esquerdo (mm)</b>	4,211 ± 0,53	4,349 ± 0,58	4,183 ± 0,56	3,708 ± 0,29 <sup>b</sup>
<b>PLVEd (mm)</b>	1,282 ± 0,29	1,284 ± 0,17	1,214 ± 0,18	1,353 ± 0,22
<b>SIVd (mm)</b>	1,060 ± 0,21	0,779 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,881 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,014 ± 0,11 <sup>b</sup>
<b>DDVEd (mm)</b>	6,687 ± 0,98	8,375 ± 1,20 <sup>a</sup>	8,445 ± 1,39 <sup>a</sup>	7,219 ± 0,69
<b>DDVEs (mm)</b>	3,821 ± 1,14	6,828 ± 1,37 <sup>a</sup>	7,033 ± 1,46 <sup>a</sup>	4,933 ± 0,71 <sup>bc</sup>

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros de ecocardiográficos morfométricos; PLVEd: espessura diastólica parede livre do ventrículo esquerdo; SIVDd: espessura diastólica do septo interventricular; DDVEd: diâmetro diastólico da cavidade do ventrículo esquerdo; DDVEs: diâmetro sistólico da cavidade do ventrículo esquerdo; a: p < 0,05 vs CTL; b: < 0,05 vs IAM; c: p < 0,05 vs IAM+EMPA3

### 6.2.3.2 Parâmetros de função sistólica

Encontram-se apresentados na tabela 20 os parâmetros ecocardiográficos relacionados a função sistólica.

Como esperado pelo efeito da isquemia miocárdica, pode se notar redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (figura 50), da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo e da FAC - mudança fracional da área – do ventrículo esquerdo (figura 51) em todos os grupos infartados. Porém, o tratamento com a dose de 10 mg/kg foi capaz de reverter essas reduções, tendo os animais apresentado médias de todos os parâmetros citados acima daquelas dos animais dos grupos IAM e IAM+EMPA3.

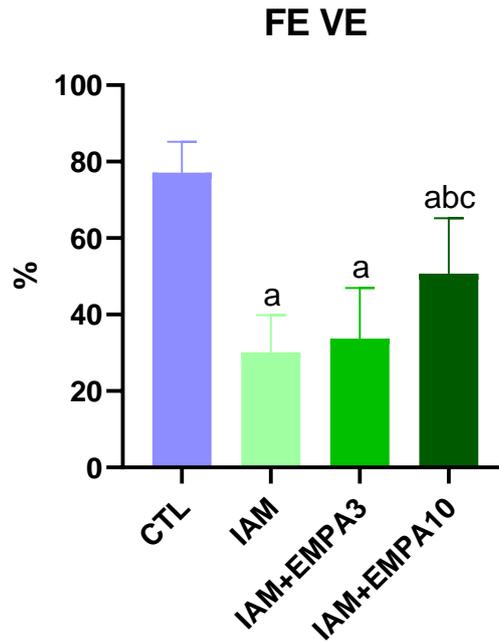


Figura 50: Fração de ejeção ventrículo esquerdo em sístole dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs IAM; c:  $p < 0,05$  vs IAM+EMPA3

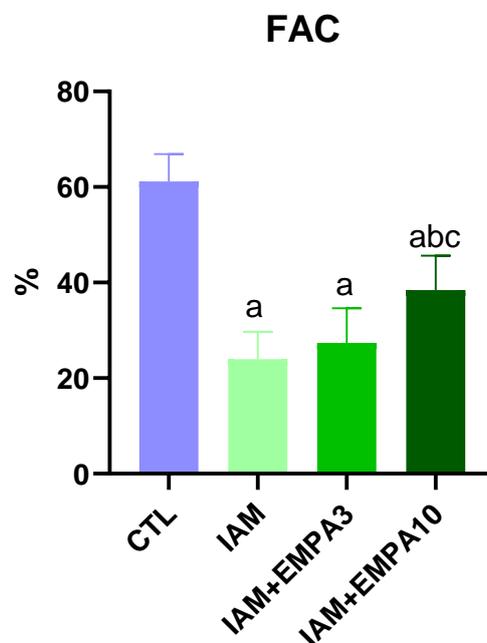


Figura 51: Mudança fracional da área do ventrículo esquerdo em sístole dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs IAM; c:  $p < 0,05$  vs IAM+EMPA3

Tabela 20: Parâmetros ecocardiográficos relacionados a função sistólica do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10)

	<b>CTL</b>	<b>IAM</b>	<b>IAM+EMPA3</b>	<b>IAM+EMPA10</b>
<b>FE VE (%)</b>	77,09 ± 8,1	30,14 ± 9,7 <sup>a</sup>	33,68 ± 13,2 <sup>a</sup>	50,69 ± 14,5 <sup>abc</sup>
<b>FEnc VE (%)</b>	46,33 ± 10,7	13,54 ± 4,8 <sup>a</sup>	17,10 ± 7,6 <sup>a</sup>	27,42 ± 0,93 <sup>abc</sup>
<b>FAC (%)</b>	61,18 ± 5,7	23,94 ± 5,7 <sup>a</sup>	27,39 ± 7,2 <sup>a</sup>	38,46 ± 7,1 <sup>abc</sup>
<b>FE VE long (%)</b>	50,91 ± 8,8	26,60 ± 5,0 <sup>a</sup>	34,45 ± 9,1 <sup>a</sup>	32,95 ± 5,6 <sup>a</sup>
<b>S' (mm/s)</b>	47,79 ± 5,9	47,84 ± 6,9	46,55 ± 3,5	47,00 ± 5,4

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros ecocardiográficos relacionados a função sistólica do ventrículo esquerdo; FE VE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo calculada pelo modo M em eixo curto; FEnc VE: fração de encurtamento do ventrículo esquerdo; FAC: mudança fracional da área da cavidade do ventrículo esquerdo; FE VE long: fração de ejeção do ventrículo esquerdo calculado pelo modo bidimensional em corte do eixo longo; S': velocidade de movimentação sistólica das fibras miocárdicas longitudinais; a: p<0,05 vs CTL; b: p<0,05 vs IAM; c: p<0,05 vs IAM+EMPA3

### 6.2.3.3 Parâmetros de função diastólica

Encontram-se apresentados na tabela 21 os parâmetros ecocardiográficos relacionados a função diastólica.

Tabela 21: Parâmetros ecocardiográficos relacionados a função diastólica do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10)

	<b>CTL</b>	<b>IAM</b>	<b>IAM+EMPA3</b>	<b>IAM+EMPA10</b>
<b>Vel. Máx. E (mm/s)</b>	1092 ± 116,5	871 ± 175	980,9 ± 100	992,8 ± 199
<b>Vel. Máx. A (mm/s)</b>	598,1 ± 103,1	549,0 ± 197,1	514,6 ± 183,7	553,6 ± 189,5
<b>E/A</b>	1,862 ± 0,21	1,861 ± 0,57	1,875 ± 0,49	1,938 ± 0,63
<b>Vel. Máx. E' (mm/s)</b>	45,02 ± 7,9	45,06 ± 32,1	44,37 ± 15,0	70,84 ± 30,3
<b>Vel. Máx. A' (mm/s)</b>	55,34 ± 19,9	74,28 ± 48,4	44,99 ± 10,4	48,12 ± 11,5
<b>E'/A'</b>	0,982 ± 0,5	0,581 ± 0,1	1,022 ± 0,4	1,654 ± 0,3 <sup>abc</sup>
<b>TRIV (ms)</b>	17,62 ± 4,0	19,40 ± 4,3	13,34 ± 2,4 <sup>ab</sup>	17,62 ± 3,9
<b>E/E'</b>	25,05 ± 4,8	28,08 ± 6,3	25,14 ± 11,8	16,24 ± 7,3 <sup>b</sup>

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros ecocardiográficos relacionados a função diastólica do ventrículo esquerdo; Vel. Máx. E: velocidade máxima da onda E do fluxo mitral; Vel. Máx. A: velocidade máxima da onda A do fluxo mitral; E/A: relação entre as ondas E e A; Vel. Máx. E': velocidade máxima da onda E' da movimentação miocárdica; Vel. Máx. A': velocidade máxima da onda A' da movimentação miocárdica; E'/A': relação entre as

ondas E' e A'; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; E/E': relação entre as ondas E e E';  
a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs IAM; c:  $p < 0,05$  vs IAM+EMPA3

Podemos notar uma importante elevação na relação E'A' no grupo tratado com empagliflozina na dose de 10 mg/kg e relação ao grupos controle, IAM e IAM+EMPA3 (figura 52).

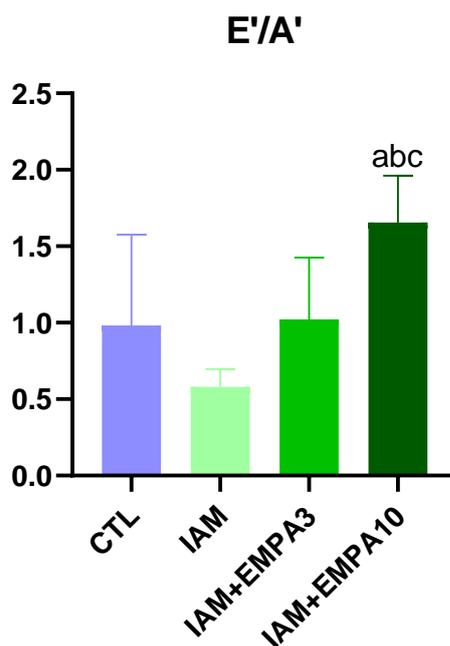


Figura 52: Relação E'/A' dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs IAM; c:  $p < 0,05$  vs IAM+EMPA3

Ainda, observamos uma redução na relação E/E' no grupo IAM+EMPA10 em relação ao grupo IAM (figura 53).

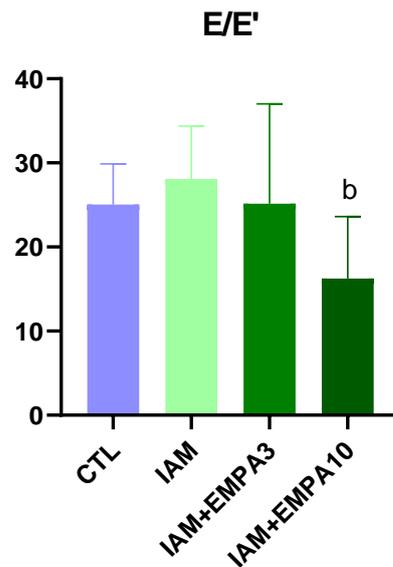


Figura 53: Relação E/E' dos animais dos grupos CTL (n=10), IAM (n=10), IAM+EMPA3 (n=10) e IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs IAM; c:  $p < 0,05$  vs IAM+EMPA3

#### 6.2.4 Quantificação do colágeno em tecido cardíaco

A área total do ventrículo esquerdo não apresentou diferença entre os grupos estudados. Já a área total do ventrículo direito foi maior nos grupos IAM+EMPA3 e IAM+EMPA10 quando comparados ao grupo CTL. (Figura 54)

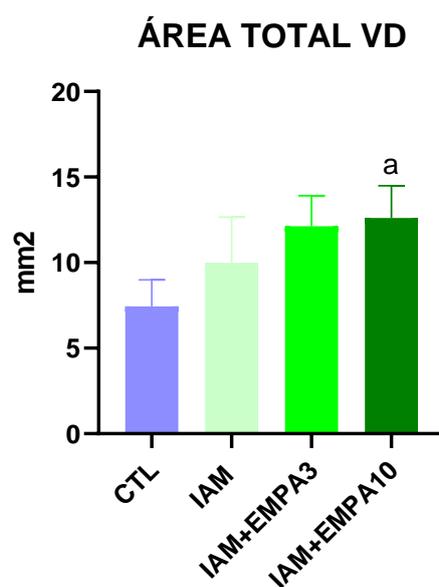


Figura 54: Área total do ventrículo direito dos animais dos grupos CTL (n=6), IAM (n=6), IAM+EMPA3 (n=6) e IAM+EMPA10 (n=6); a:  $p < 0,05$  vs CTL

Em relação a área de colágeno total no ventrículo esquerdo, apresentou-se aumentada nos grupo IAM e IAM+EMPA3 em relação ao grupo controle, o que não foi observado no grupo IAM+EMPA10. Ainda, as porcentagens de área total de colágeno no ventrículo esquerdo foram menores nos grupos IAM+EMPA3 e IAM+EMPA10 em relação ao grupo IAM (figuras 55 e 56)

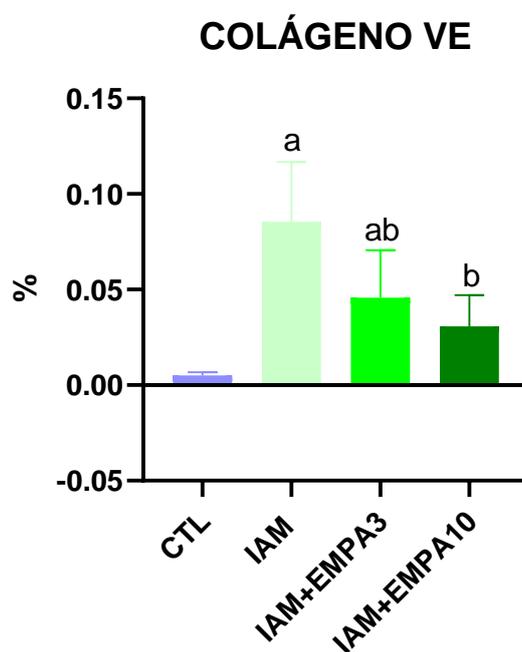


Figura 55: Área total de colágeno do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), IAM (n=6), IAM+EMPA3 (n=6) e IAM+EMPA10 (n=6); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs IAM

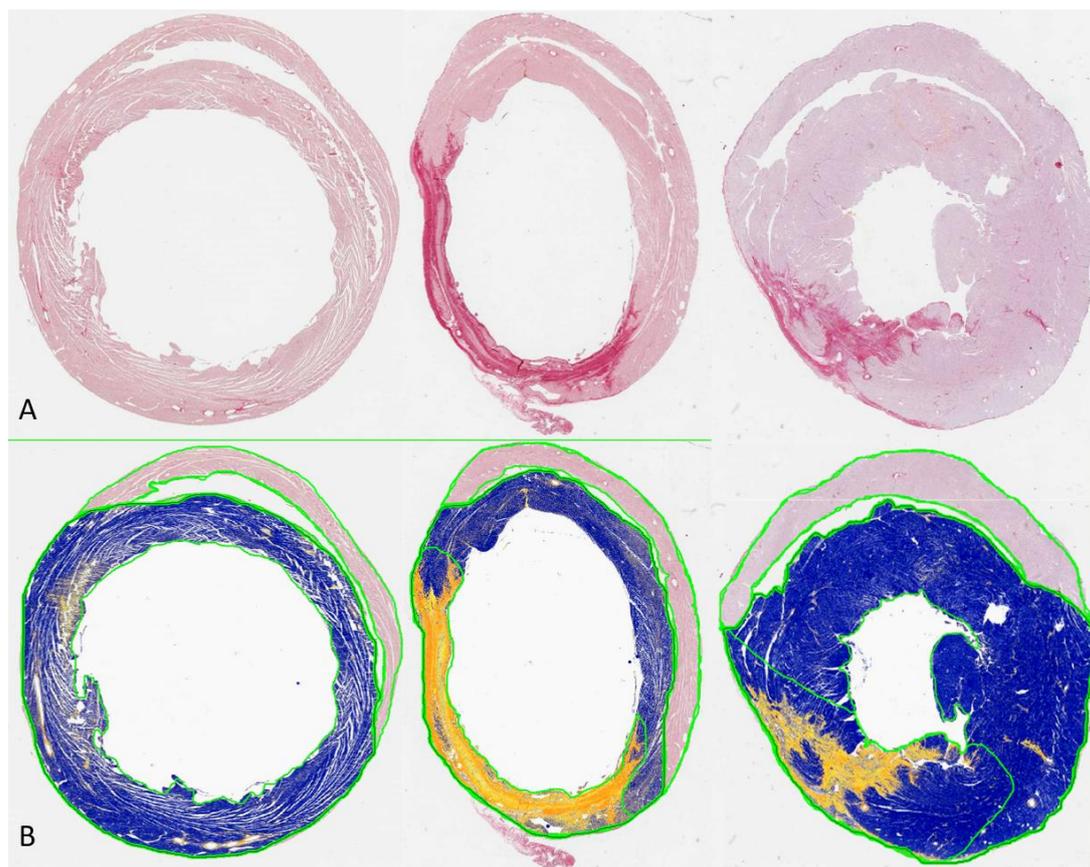


Figura 56: Figura representativa dos cortes histológicos na linha A; e das áreas totais de tecido ventricular esquerdo (azul) e colágeno (amarelo) na linha B, respectivamente nos grupos CTL, IAM e IAM+EMPA10

Em relação a porcentagem de colágeno no ventrículo direito não se notou mudança entre os grupos estudados. (Tabela 22)

Tabela 22: Avaliação histológica dos ventrículos esquerdo e direito dos animais dos grupos CTL (n=6), IAM (n=6), IAM+EMPA3 (n=6) e IAM+EMPA10 (n=6)

	CTL	IAM	IAM+EMPA3	IAM+EMPA10
<b>Área total do VE (mm<sup>2</sup>)</b>	62,89 ± 16,2	81,30 ± 16,2	86,64 ± 15,3	77,68 ± 8,5
<b>% colágeno VE</b>	0,5089 ± 0,1	8,537 ± 3,1 <sup>a</sup>	4,577 ± 2,4 <sup>ab</sup>	3,068 ± 1,6 <sup>b</sup>
<b>% colágeno VE/mm<sup>2</sup></b>	0,3262 ± 12,4	6,759 ± 2,1 <sup>a</sup>	4,161 ± 2,5 <sup>a</sup>	2,377 ± 1,3 <sup>b</sup>
<b>Área total VD</b>	7,43 ± 1,5	9,986 ± 2,67	12,12 ± 1,7 <sup>a</sup>	12,61 ± 1,8 <sup>a</sup>
<b>% colágeno VD</b>	0,09764 ± 0,2	0,1309 ± 0,06	0,08417 ± 0,03	0,0756 ± 0,05

Tabela representativa das médias ± desvio padrão; a: p<0,05 vs CTL; b: p<0,05 vs IAM

## 6.2.5 Expressão de proteínas cardíacas

### 6.2.5.1 Expressão de proteínas envolvidas na regulação intracelular do cálcio

As proteínas avaliadas encontram-se apresentadas na tabela 23.

Notou-se um aumento do fosfolambam fosforilado no grupo IAM em relação ao grupo CTL, o que foi normalizado pelo uso da empagliflozina (figura 57).

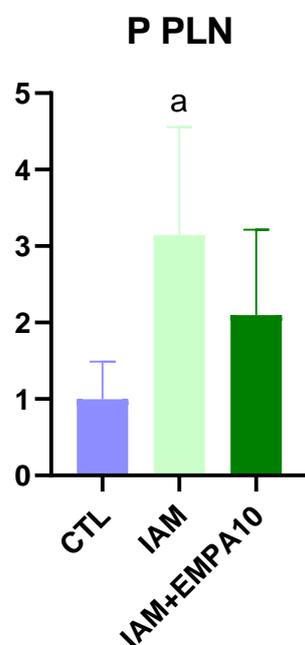


Figura 57: Expressão do fosfolambam fosforilado do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), IAM (n=6) e IAM+EMPA10 (n=6); a:  $p < 0,05$  vs CTL

Ainda, observou-se um aumento na expressão da SERCA2 no grupo IAM versus grupo controle. Este aumento não foi observado no grupo tratado (figura 58)

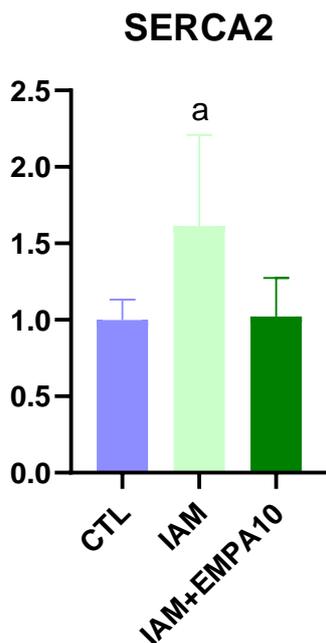


Figura 58: Expressão da SERCA2 do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), IAM (n=6) e IAM+EMPA10 (n=6); a: p<0,05 vs CTL

Tabela 23: Expressão de proteínas envolvidas na recaptção de Ca<sup>2+</sup> pelo retículo sarcoplasmático do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), IAM (n=6), IAM+EMPA3 (n=6) e IAM+EMPA10 (n=6)

	CTL	IAM	IAM+EMPA10
<b>PLN</b>	1,000 ± 0,50	1,597 ± 0,81	1,445 ± 0,42
<b>P PLN</b>	0,999 ± 0,49	3,142 ± 1,41 <sup>a</sup>	2,099 ± 1,11
<b>P PLN/PLN</b>	1,000 ± 0,01	0,5428 ± 0,32	0,9005 ± 0,50
<b>SERCA2</b>	1,000 ± 0,13	1,614 ± 0,59 <sup>a</sup>	1,022 ± 0,25
<b>SERCA2/PLN</b>	1,228 ± 0,59	0,5907 ± 0,37	0,4777 ± 0,44

Tabela representativa das médias ± desvio padrão das proteínas envolvidas na recaptção de Ca<sup>2+</sup> - expressas em unidades de medida arbitrárias. PLN: fosfolambam; P PLN: fosfolambam fosforilado total; P PLN/PLN: relação fosfolambam fosforilado total / fosfolambam; SERCA2: ; SERCA2/PLN: relação SERCA2/fosfolambam. a: p<0,05 vs CTL

### 6.2.5.2 Expressão de proteínas de matriz extracelular

Em relação a ERK 1/2 total, notou-se o aumento de sua expressão no grupo IAM quando comparado ao grupo controle. Ainda, no grupo tratado, estas proteínas encontraram-se reduzidas em relação ao grupo infartado (figura 59).

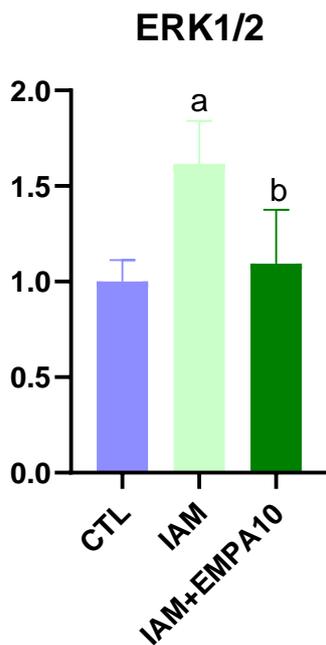


Figura 59: Expressão das proteínas de matriz extracelular ERK1/2 totais do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), IAM (n=6) e IAM+EMPA10 (n=6); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs IAM

A ERK 1/2 fosforilada apresentou-se aumentada em ambos os grupos infartados independentemente de tratamento (figura 60 e tabela 24).

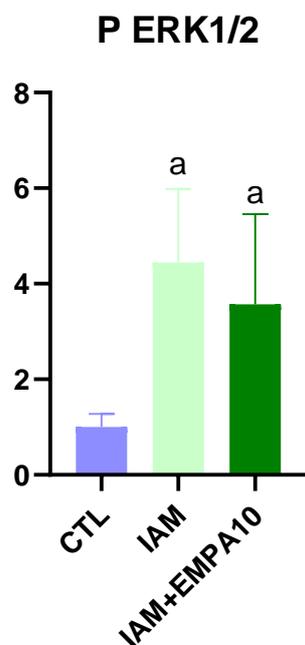


Figura 60: Expressão das proteínas de matriz extracelular ERK1/2 fosforiladas do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), IAM (n=6) e IAM+EMPA10 (n=6)

Ainda, a relação ERK 1/2 fosforilada/ERK 1/2 total, apresentou-se apenas aumentada no grupo IAM+EMPA10 em relação ao grupo controle (figura 61).

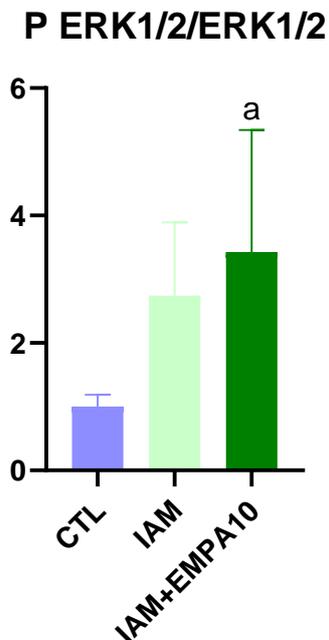


Figura 61: Expressão da relação ERK1/2 fosforilada/ERK1/2 total do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), IAM (n=6) e IAM+EMPA10 (n=6);  
a: p<0,05 vs CTL

Tabela 24: Expressão de proteínas de matriz extracelular dos animais dos grupos CTL (n=6), DM (n=6), DM+EMPA3 (n=6) e DM+EMPA10 (n=6)

	<b>CTL</b>	<b>IAM</b>	<b>IAM+EMPA10</b>
<b>ERK 1/2</b>	1,000 ± 0,11	1,616 ± 0,22 <sup>a</sup>	1,094 ± 0,28 <sup>b</sup>
<b>P ERK 1/2</b>	1,000 ± 0,27	4,441 ± 1,53 <sup>a</sup>	3,573 ± 1,88 <sup>a</sup>
<b>P ERK 1/2/ ERK 1/2</b>	1,000 ± 0,18	2,745 ± 1,14	3,429 ± 1,91 <sup>a</sup>

Tabela representativa das médias ± desvio padrão; a: p<0,05 vs CTL; b: p<0,05 vs IAM

### 6.2.6 Estresse oxidativo

Estão apresentadas na tabela 25 as medidas de estresse oxidativo dos grupos CTL, IAM e IAM+EMPA10.

Tabela 25: Parâmetros de estresse oxidativo no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), IAM (n=6), IAM+EMPA3 (n=6) e IAM+EMPA10 (n=6)

	CTL	IAM	IAM+EMPA10
<b>Carbonilas</b>	8,610 ± 1,08	9,120 ± 1,85	8,429 ± 1,94
<b>Peróxido</b>	2,882 ± 0,37	3,140 ± 0,81	2,720 ± 0,62
<b>NADPH oxidase</b>	0,2050 ± 0,03	0,3155 ± 0,09	0,2223 ± 0,05
<b>CAT</b>	0,9717 ± 0,17	0,5433 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,7536 ± 0,29
<b>SOD</b>	13,94 ± 0,91	12,82 ± 1,50	16,00 ± 1,8 <sup>b</sup>
<b>FRAP</b>	0,6716 ± 0,14	0,7358 ± 0,18	0,7090 ± 0,22
<b>Nitrito</b>	1,594 ± 0,54	0,880 ± 0,25 <sup>a</sup>	1,624 ± 0,30 <sup>b</sup>

Tabela representativa das médias ± desvio padrão dos parâmetros de estresse oxidativo: a: p<0,05 vs CTL; b: p<0,05 vs IAM

Em relação a CAT, notou-se sua redução no grupo IAM em relação ao grupo CTL, o que foi normalizado pelo uso da empagliflozina (Figura 62).

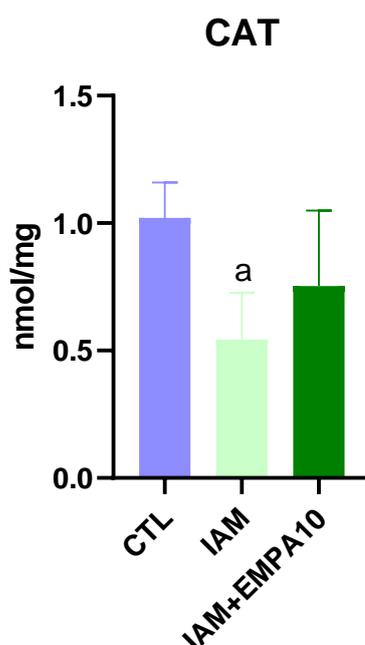


Figura 62: Expressão da enzima catalase no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), IAM (n=6) e IAM+EMPA10 (n=6); a: p<0,05 vs CTL

A SOD apresentou-se aumentada no grupo IAM+EMPA10 quando comparada com o grupo IAM (Figura 53).

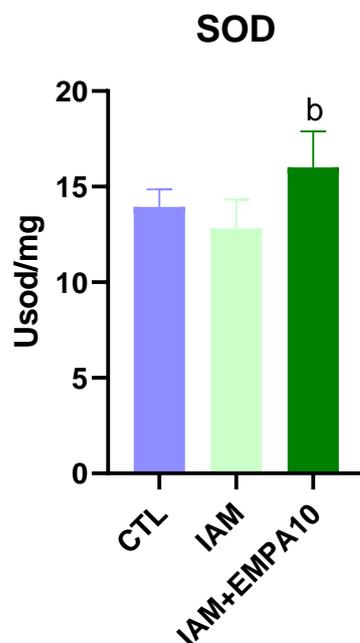


Figura 63: Expressão da enzima superóxido dismutase no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), IAM (n=6) e IAM+EMPA10 (n=6); b:  $p < 0,05$  vs IAM

O nitrito apresentou-se reduzida no grupo IAM quando comparado ao grupo controle, e ainda, aumentada no grupo IAM+EMPA10 em relação ao grupo IAM (Figura 64).

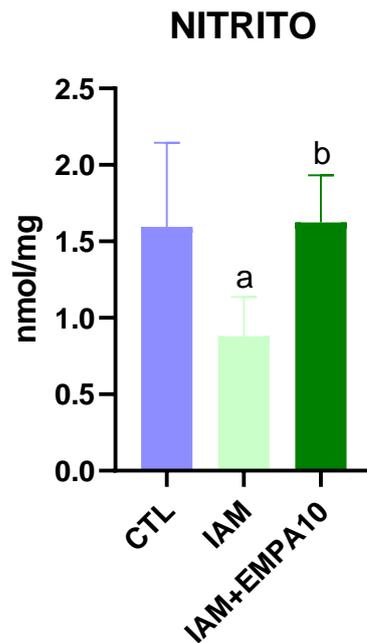


Figura 64: Expressão do nitrito no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), IAM (n=6) e IAM+EMPA10 (n=6); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs IAM

### 6.3 Efeitos da Empagliflozina sobre o infarto agudo do miocárdio em animais diabéticos

#### 6.3.1 Avaliação metabólica

##### 6.3.1.1 Peso Corporal

No início do protocolo o peso dos animais dos grupos CTL, DM+IAM, DM+IAM+EMPA3 e DM+IAM+EMPA10 foi semelhante (figura 65).

Após a indução do diabetes pela STZ, houve redução de peso significativa apenas no grupo DM+IAM+EMPA3 em relação ao controle (figura 66).

Ao final do protocolo, observou-se redução do peso dos animais diabéticos e infartados em relação ao grupo controle, independentemente de tratamento, em relação ao grupo controle. (Figura 67 e Tabela 26).

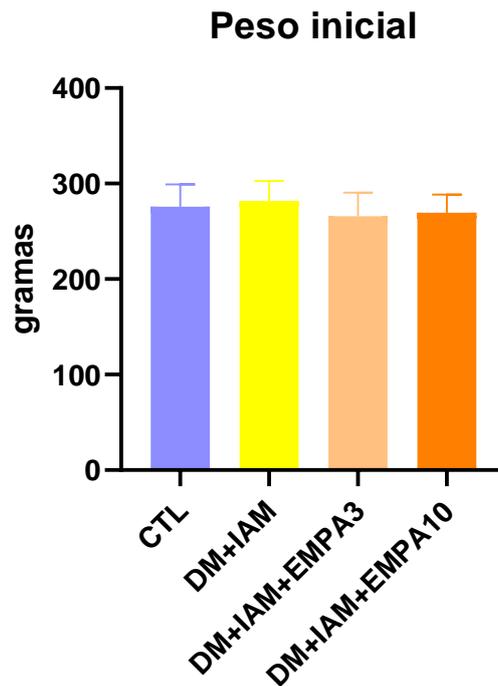


Figura 65: Peso dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10), no momento inicial do protocolo

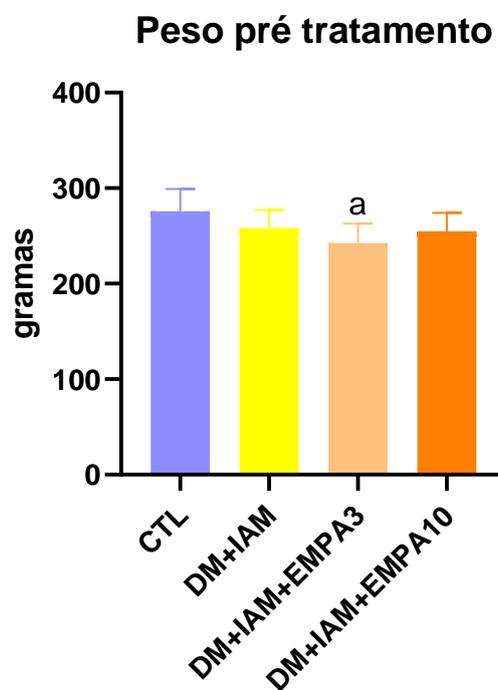


Figura 66: Peso dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10), no momento pré tratamento;  
a:  $p < 0,05$  vs CTL

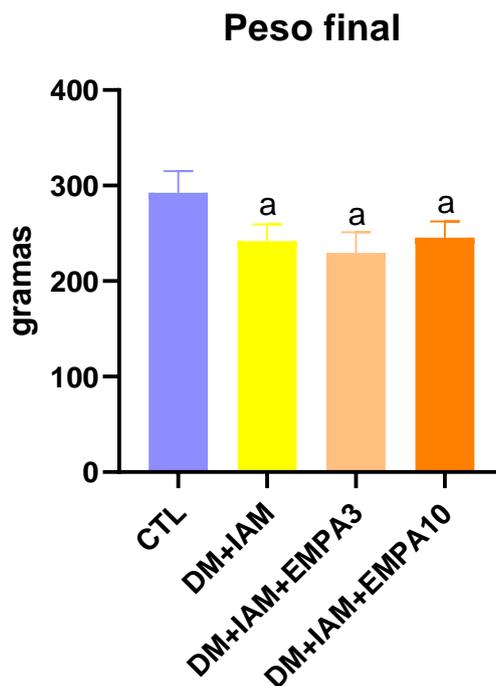


Figura 67: Peso dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10), no momento final do protocolo; a:  $p < 0,05$  vs CTL

Tabela 26 – Peso dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10) nos momentos: início do protocolo, pré tratamento e após tratamento (final do protocolo)

		Inicial	Pré tratamento	Pós tratamento
<b>Peso (gramas)</b>	<b>CTL</b>	275,7 ± 23,5	275,7 ± 23,5	292,6 ± 22,7
	<b>DM+IAM</b>	281,9 ± 21,0	258,3 ± 19,0	241,9 ± 17,6 <sup>a</sup>
	<b>DM+IAM+EMPA3</b>	265,9 ± 24,5	242,5 ± 20,2 <sup>a</sup>	229,5 ± 21,7 <sup>a</sup>
	<b>DM+IAM+EMPA10</b>	269,6 ± 18,8	254,9 ± 19,2	245,4 ± 17,2 <sup>a</sup>

Valores expressos em média ± DPM; a  $p < 0,05$  vs CTL

### 6.3.1.2 Glicemia

No tempo inicial do protocolo, não houve diferença significativa nos valores de glicemia nos animais dos grupos estudados. (Tabela 27, figura 68)

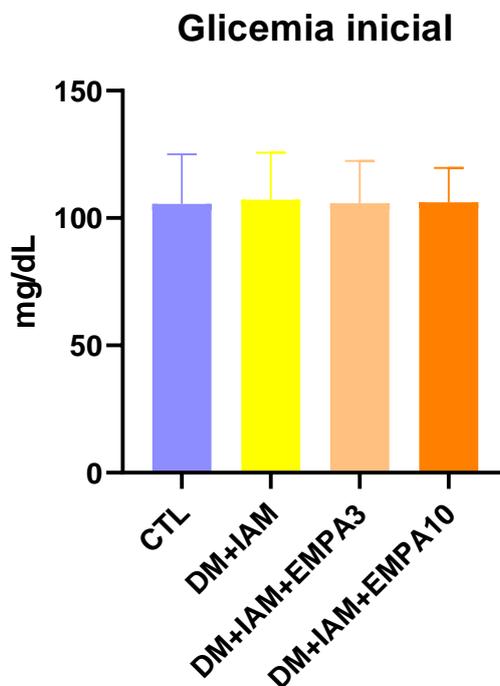


Figura 68: Glicemia dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10), no momento inicial do protocolo

Contudo, confirmando a eficácia da indução do diabetes pela STZ, houve aumento significativo da glicemia nos animais dos grupos DM+IAM, DM+IAM+EMPA3 e DM+IAM+EMPA10, em relação ao grupo CTL. (Figura 69)

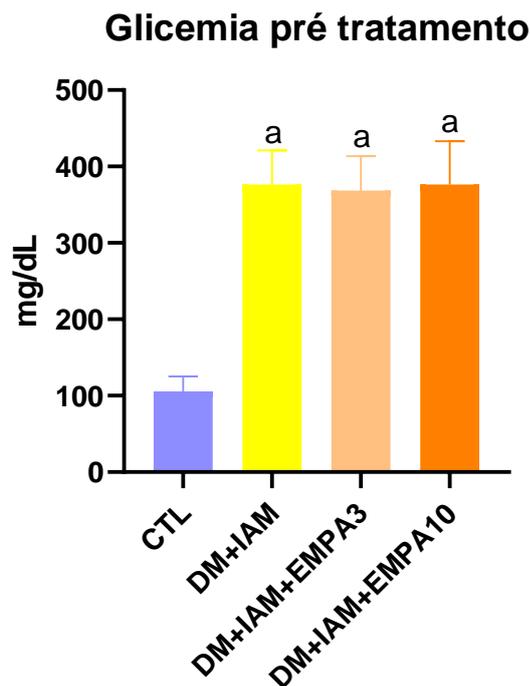


Figura 69: Glicemia dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10), no momento pré tratamento; a:  $p < 0,05$  vs CTL

No período pós tratamento, os animais diabéticos e infartados, independente do tratamento, apresentaram glicemia maior do que os animais do grupo CTL. Contudo, notou-se redução da glicemia nos grupos tratados com ambas as doses de empagliflozina em relação ao grupo DM+IAM. Adicionalmente, houve redução da glicemia no grupo tratado com a dose de 10 mg/kg, quando comparado com o grupo tratado com a dose de 3 mg/kg (Figura 69).

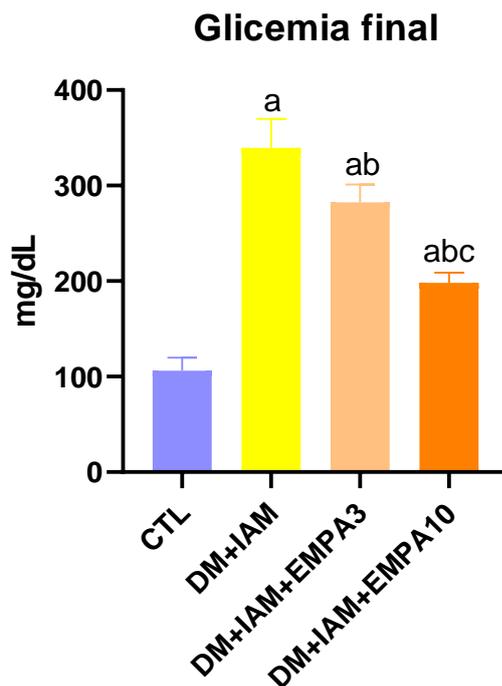


Figura 69: Glicemia dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10), no momento final do protocolo;  
a: p<0,05 vs CTL; b: p<0,05 vs DM+IAM; c: p<0,05 vs DM+IAM+EMPA3

Tabela 27 – Glicemia dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10), nos momentos: início do protocolo, pré tratamento e após tratamento (final do protocolo)

		Inicial	Pré tratamento	Pós tratamento
<b>Glicose (mg/dL)</b>	<b>CTL</b>	105,6 ± 19,5	105,6 ± 19,5	106,1 ± 13,6
	<b>DM+IAM</b>	107,1 ± 18,5	376,3 ± 44,7 <sup>a</sup>	339,5 ± 30,4 <sup>a</sup>
	<b>DM+IAM+EMPA3</b>	105,8 ± 16,6	368,6 ± 44,8 <sup>a</sup>	282,5 ± 18,5 <sup>ab</sup>
	<b>DM+IAM+EMPA10</b>	106,1 ± 13,5	376,5 ± 56,5 <sup>a</sup>	198,1 ± 10,7 <sup>abc</sup>

Valores expressos em média ± DPM; a: p<0,05 vs CTL; b: p<0,05 vs DM+IAM; c: p<0,05 vs DM+IAM+EMPA3

### 6.3.1.3 Triglicerídeos

Os valores de triglicerídeos apresentaram-se de forma semelhante no início do protocolo entre os grupos estudados (figura 70).

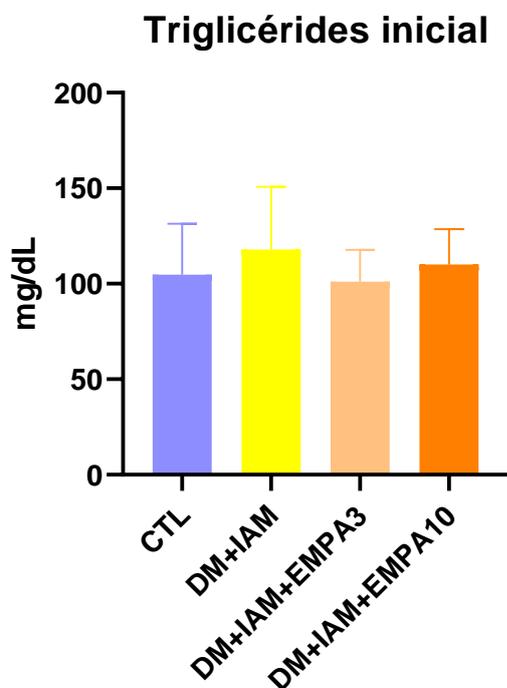


Figura 70: Triglicérides dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10), no momento inicial do protocolo

Após a indução do diabetes, assim como no final do protocolo, não houve aumento significativo dos triglicerídeos entre os grupos em relação ao grupo controle (Figuras 71 e 72 e Tabela 28).

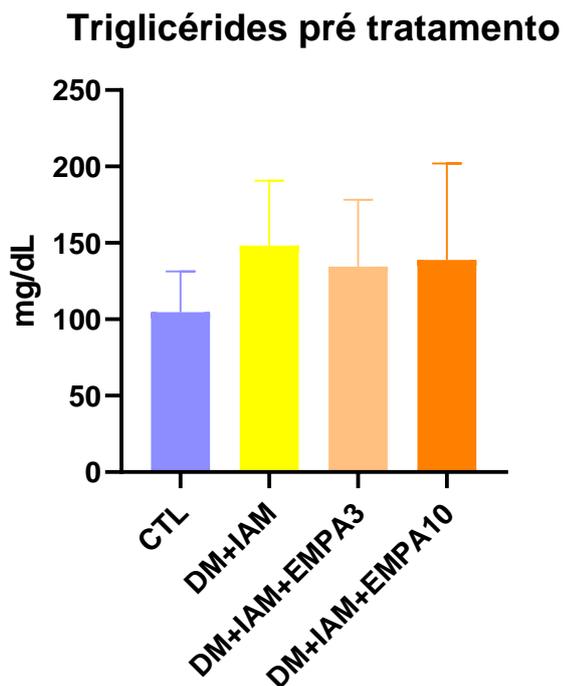


Figura 71: Triglicérides dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10), no momento pré tratamento

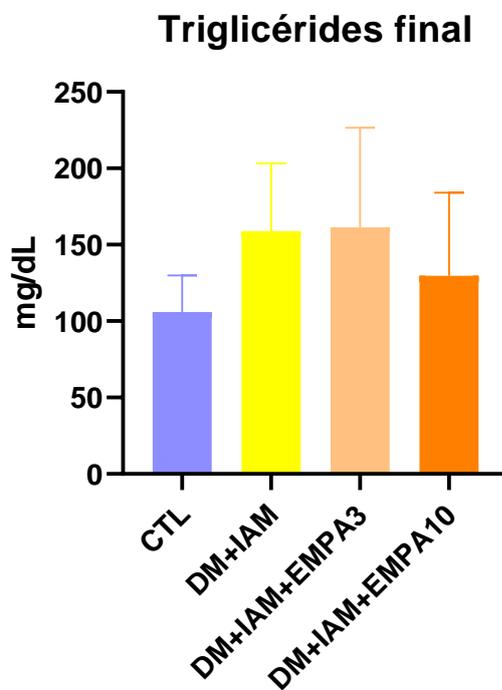


Figura 72: Triglicérides dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10), no momento final do protocolo

Os valores não foram diferentes em relação aos controles, embora as médias sejam altas, isso pode ser atribuído a uma variabilidade dos triglicérides, provavelmente atribuída ao tratamento e a variabilidade de resposta induzida pela streptozotocina.

Tabela 28 – Triglicérides dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10), nos momentos: início do protocolo, pré tratamento e após tratamento (final do protocolo)

		Inicial	Pré tratamento	Pós tratamento
Triglicérides (mg/dL)	<b>CTL</b>	104,7 ± 26,7	104,7 ± 26,7	106,0 ± 23,8
	<b>DM+IAM</b>	117,9 ± 32,8	148,1 ± 42,5	158,9 ± 44,2
	<b>DM+IAM+EMPA3</b>	101,1 ± 16,6	134,5 ± 43,8	161,3 ± 65,2
	<b>DM+IAM+EMPA10</b>	110,1 ± 18,4	138,9 ± 63,0	129,6 ± 54,4

Valores expressos em média ± DPM

### 6.3.2 Avaliação hemodinâmica

#### 6.3.2.1 Pressão arterial sistólica (PAS)

Ao final do protocolo, houve redução nos valores de pressão arterial sistólica entre os animais de todos os grupos diabéticos e infartados, independentemente de tratamento, em relação ao grupo controle (CTL: 136,4 ± 5,9; DM+IAM: 114,6 ± 7,0; DM+IAM+EMPA3: 108,1 ± 5,2 e DM+IAM+EMPA10: 117,8 ± 13,7 mmHg) (Figura 73).

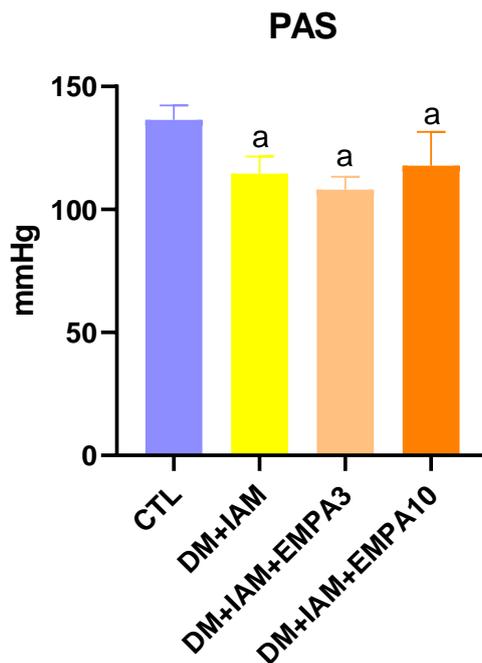


Figura 73: Pressão arterial sistólica dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL

### 6.3.2.2 Pressão arterial diastólica (PAD)

Para os valores de pressão arterial diastólica, ao final do protocolo, houve redução nos valores entre os animais de todos os grupos diabéticos e infartados, independentemente de tratamento, em relação ao grupo controle (CTL:  $92,95 \pm 5,7$ ; DM+IAM:  $83,81 \pm 4,5$ ; DM+IAM+EMPA3:  $81,61 \pm 5,7$  e DM+IAM+EMPA10:  $81,70 \pm 8,2$  mmHg) (Figura 74).

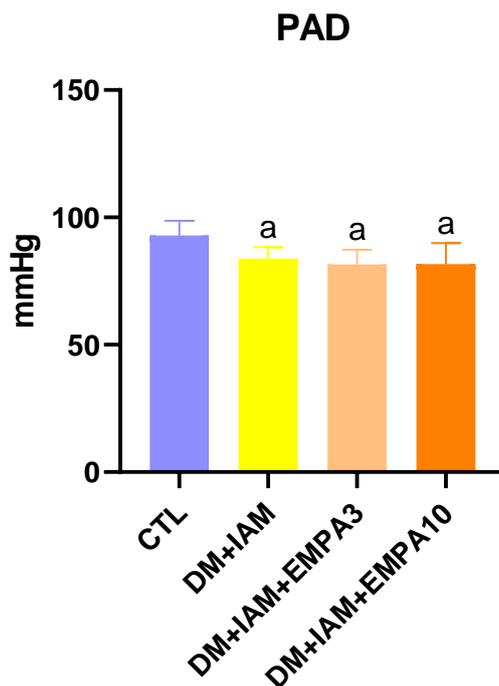


Figura 74: Pressão arterial diastólica dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL

### 6.3.2.3 Pressão arterial média (PAM)

Em relação a pressão arterial média, ao final do protocolo, houve redução nos valores entre os animais de todos os grupos diabéticos e infartados, independentemente de tratamento, em relação ao grupo controle (CTL:  $112,1 \pm 5,9$ ; DM+IAM:  $98,55 \pm 5,2$ ; DM+IAM+EMPA3:  $94,51 \pm 5,3$  e DM+IAM+EMPA10:  $98,57 \pm 10,1$  mmHg) (Figura 75).

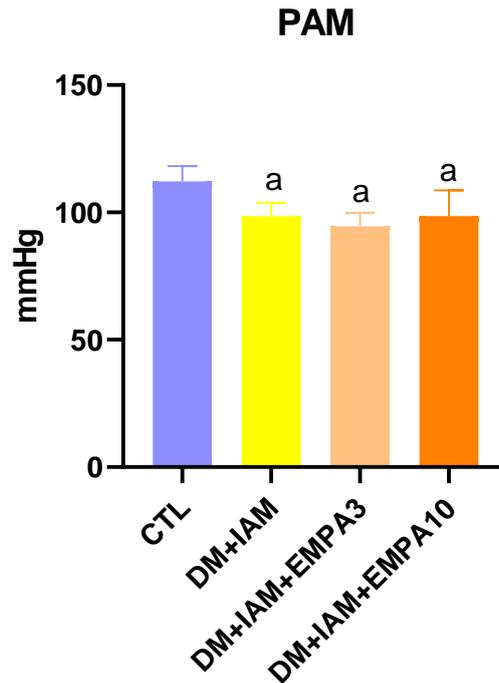


Figura 75: Pressão arterial média dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL

#### 6.3.2.4 Pressão de pulso

A pressão de pulso, apresentou-se reduzida nos animais dos grupos DM+IAM e DM+IAM+EMPA3, quando comparada ao grupo CTL. Contudo o tratamento com empagliflozina na dose de 10 mg/kg, foi capaz de elevar a pressão de pulso, ao nível do grupo CTL, ainda, sendo maior do que aquela no grupo DM+IAM. (Pressão de pulso: CTL:  $43,50 \pm 2,30$ ; DM+IAM:  $30,79 \pm 3,7$ ; DM+IAM+EMPA3:  $26,46 \pm 1,5$ ; DM+IAM+EMPA10:  $38,48 \pm 7,0$  mmHg). (Figura 76).

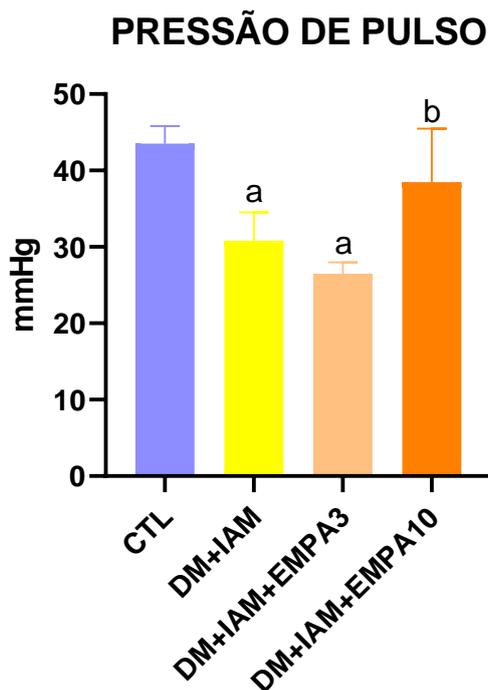


Figura 76: Pressão de pulso dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM

### 6.3.2.5 Frequência cardíaca média (FCM)

Não se observou redução da frequência cardíaca média entre os grupos CTL, DM+IAM, DM+IAM+EMPA3 e DM+IAM+EMPA10. (Frequência cardíaca média: CTL:  $350,5 \pm 24,65$ ; DM+IAM:  $299,8 \pm 48,6$ ; DM+IAM+EMPA3:  $337,4 \pm 44,6$ ; DM+IAM+EMPA10:  $325,0 \pm 58,0$  bpm). (Figura 77).

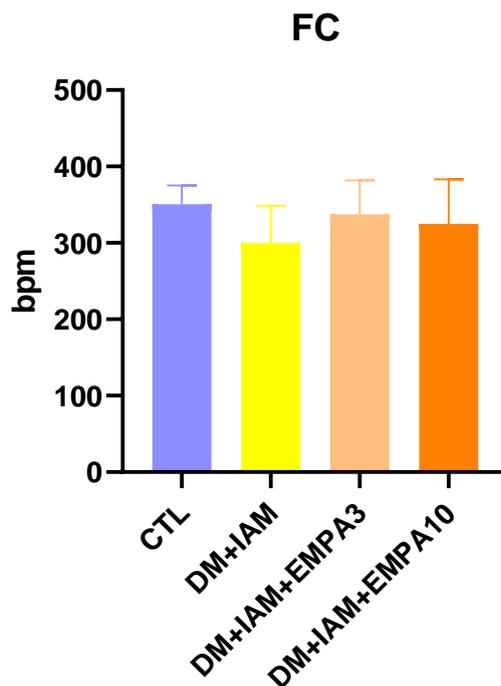


Figura 77: Frequência cardíaca média dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10)

### 6.3.2.6 Resposta bradicárdica

Houve redução significativa nos índices de bradicardia reflexa nos animais do grupo diabético e infartado (DM+IAM) e no grupo diabético, infartado e tratado com empagliflozina na dose de 3 mg/kg (DM+IAM+EMPA3), quando comparados ao grupo controle (CTL). Contudo o tratamento com empagliflozina em dose mais alta (DM+IAM+EMPA10), foi capaz de elevar as respostas, ao nível do grupo CTL. Ainda, a resposta bradicárdica do grupo DM+IAM+EMPA10, foi maior do que aquela dos grupos DM+IAM e DM+IAM+EMPA3 (Bradicardia reflexa: CTL:  $-1,43 \pm 0,24$ ; DM+IAM:  $-0,62 \pm 0,15$ ; DM+IAM+EMPA3:  $-1,00 \pm 0,43$ ; DM+IAM+EMPA10:  $-1,54 \pm 0,21$  bpm/mmHg) (Figura 78)

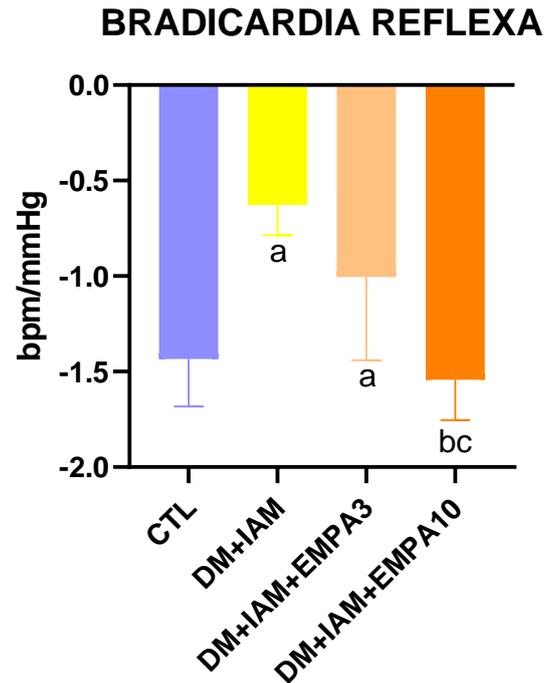


Figura 78: Resposta bradicárdica dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10);  
 a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM; c:  $p < 0,05$  vs DM+IAM+EMPA3

### 6.3.2.7 Resposta taquicárdica

A resposta taquicárdica foi encontrada aumentada no grupo DM+IAM+EMPA3 quando comparada aos grupos CTL, DM+IAM e DM+IAM+EMPA10. (Taquicardia reflexa: CTL:  $3,25 \pm 0,68$ ; DM+IAM:  $4,28 \pm 0,17$ ; DM+IAM+EMPA3:  $6,77 \pm 2,0$ ; DM+IAM+EMPA10:  $4,26 \pm 0,50$  bpm/mmHg) (Figura 79)

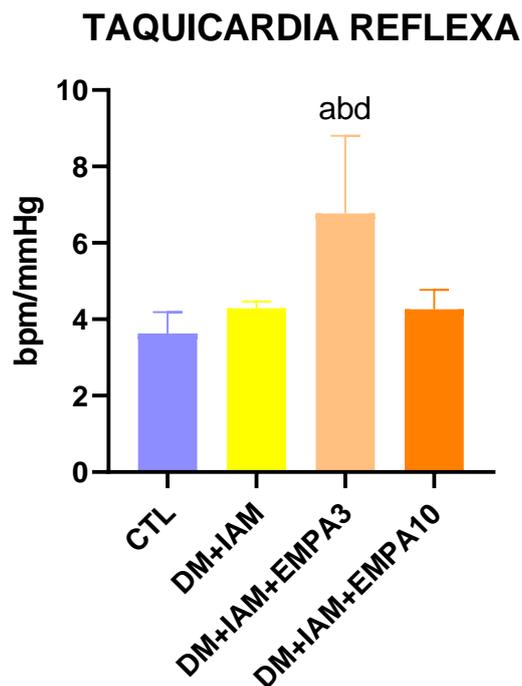


Figura 79: Resposta taquicárdica dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10);  
 a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM; d:  $p < 0,05$  vs DM+IAM+EMPA10

### 6.3.2.8 Sensibilidade barorreflexa espontânea

Para os índices analisados relacionados a sensibilidade barorreflexa espontânea, houve apenas redução significativa do índice de eficiência barorreflexa para rampas de descida (BEI down) no grupo DM+IAM+EMPA10 em relação ao grupo DM+IAM+EMPA3. Contudo, não foram observadas diferenças nos demais parâmetros entre os grupos, conforme tabela 29.

Tabela 29: Índices do método da sequência dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10)

	CTL	DM+IAM	DM+IAM+EMPA3	DM+IAM+EMPA10
<b>BEI down (ms/mmHg)</b>	0,1191 ± 0,05	0,1056 ± 0,05	0,0606 ± 0,04	0,1633 ± 0,08 <sup>c</sup>
<b>BEI up (ms/mmHg)</b>	0,0941 ± 0,05	0,0985 ± 0,07	0,0481 ± 0,01	0,0905 ± 0,04
<b>BEI all (ms/mmHg)</b>	0,1028 ± 0,05	0,1119 ± 0,07	0,0526 ± 0,01	0,0893 ± 0,03
<b>BGI down (ms/mmHg)</b>	4,526 ± 1,63	6,871 ± 5,7	6,561 ± 4,89	3,666 ± 1,38
<b>BGI up (ms/mmHg)</b>	2,625 ± 1,09	2,803 ± 1,48	2,999 ± 1,24	2,478 ± 1,42
<b>BGI all (ms/mmHg)</b>	3,547 ± 0,83	3,146 ± 0,96	2,967 ± 1,18	3,298 ± 0,82

Tabela representativa das médias  $\pm$  desvio padrão da média dos parâmetros do método da sequência. BEI down (ms/mmHg): índice de eficiência barorreflexa para rampas de descida; BEI up (ms/mmHg): índice de eficiência barorreflexa para rampas de subida; BEI all (ms/mmHg): índice de eficiência barorreflexa para rampas absolutas; BGI down: índice de ganho barorreflexo para rampas de descida; BGI up: índice de ganho barorreflexo para rampas de subida; BGI all: índice de ganho barorreflexo para rampas absolutas. c:  $p < 0,05$  vs DM+IAM+EMPA3

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

Os índices utilizados na avaliação da variabilidade da frequência cardíaca encontram-se apresentados na tabela 30.

Tabela 30: Índices de variabilidade da frequência cardíaca dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10)

	CTL	DM+IAM	DM+IAM+EMPA3	DM+IAM+EMPA10
<b>DP IP (ms)</b>	6,872 $\pm$ 1,31	8,720 $\pm$ 5,29	5,895 $\pm$ 2,37	7,333 $\pm$ 3,21
<b>Var IP (ms<sup>2</sup>)</b>	48,78 $\pm$ 18,91	52,41 $\pm$ 27,81	39,43 $\pm$ 31,30	43,35 $\pm$ 18,73
<b>RMSSD (ms)</b>	4,883 $\pm$ 0,68	6,864 $\pm$ 2,65	7,732 $\pm$ 3,86	7,656 $\pm$ 3,17
<b>LF IP (ms<sup>2</sup>)</b>	2,677 $\pm$ 1,20	8,150 $\pm$ 6,16 <sup>a</sup>	0,9180 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>	2,489 $\pm$ 1,58 <sup>b</sup>
<b>HF IP (ms<sup>2</sup>)</b>	6,580 $\pm$ 1,87	6,685 $\pm$ 3,20	7,263 $\pm$ 0,88	17,09 $\pm$ 7,55 <sup>abc</sup>
<b>Power total (ms<sup>2</sup>)</b>	26,80 $\pm$ 10,21	36,00 $\pm$ 20,29	18,21 $\pm$ 13,85	25,27 $\pm$ 11,48
<b>LF (nu)</b>	26,57 $\pm$ 11,0	31,34 $\pm$ 5,1	8,32 $\pm$ 1,7 <sup>ab</sup>	16,03 $\pm$ 9,0 <sup>b</sup>
<b>HF (nu)</b>	73,43 $\pm$ 11,08	68,66 $\pm$ 5,1	91,68 $\pm$ 1,7 <sup>ab</sup>	83,98 $\pm$ 9,0 <sup>b</sup>
<b>LF/HF</b>	0,3903 $\pm$ 0,21	0,4628 $\pm$ 0,11	0,0910 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>	0,2042 $\pm$ 0,14
<b>0V (%)</b>	36,96 $\pm$ 11,54	22,34 $\pm$ 7,5 <sup>a</sup>	24,20 $\pm$ 9,3	29,37 $\pm$ 13,46
<b>1V (%)</b>	36,24 $\pm$ 4,91	38,61 $\pm$ 5,08	33,02 $\pm$ 2,14	36,17 $\pm$ 7,34
<b>2V (%)</b>	26,97 $\pm$ 7,43	39,04 $\pm$ 8,13	42,78 $\pm$ 11,12 <sup>a</sup>	34,47 $\pm$ 12,36

Tabela representativa das médias  $\pm$  desvio padrão da média dos parâmetros de variabilidade da Frequência Cardíaca. DP IP (ms): Desvio Padrão do Intervalo de pulso; Var IP (ms<sup>2</sup>): Variância do Intervalo de pulso; RMSSD (ms): Raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças dos intervalos de pulso consecutivos; LF IP: Modulação de baixa frequência absoluto (ms<sup>2</sup>)ve normalizado (un); HF IP: Modulação de alta frequência absoluto (ms<sup>2</sup>) e normalizado (un); Power total: potência total do sinal; LF/HF IP: Balanço simpato-vagal; 0V (%): zero variação; 1V (%): uma variação; 2V: duas variações. a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM; c:  $p < 0,05$  vs DM+IAM+EMPA3

Notou-se aumento da modulação de baixa frequência do intervalo de pulso absoluta (LF IP) no grupo DM+IAM em relação ao grupo CTL. Ainda, notou-se redução do parâmetro em ambos os grupos tratados em relação ao grupo DM+IAM. (Figura 80)

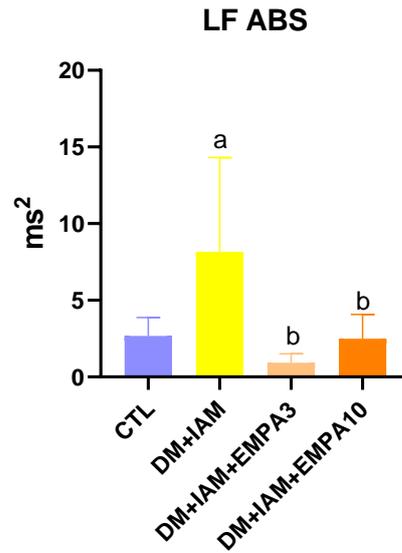


Figura 80: Modulação de baixa frequência absoluta do intervalo de pulso dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM

Quanto a modulação de alta frequência do intervalo de pulso absoluta, notou-se aumento do parâmetro no grupo DM+IAM+EMPA10 em relação a todos os demais grupos (figura 81).

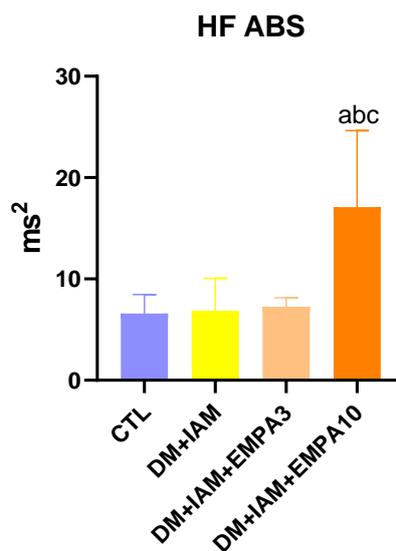


Figura 81: Modulação de alta frequência absoluta do intervalo de pulso dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM; c:  $p < 0,05$  vs DM+IAM+EMPA3

Em relação a modulação de baixa frequência do intervalo de pulso normalizada, notou-se redução no grupo tratado com empagliflozina na dose de 3 mg/kg em relação aos grupos controle e DM+IAM. Ainda, o tratamento com a dose de 10 mg/kg foi capaz de reduzir o parâmetro em relação ao grupo DM+IAM. (figura 82)

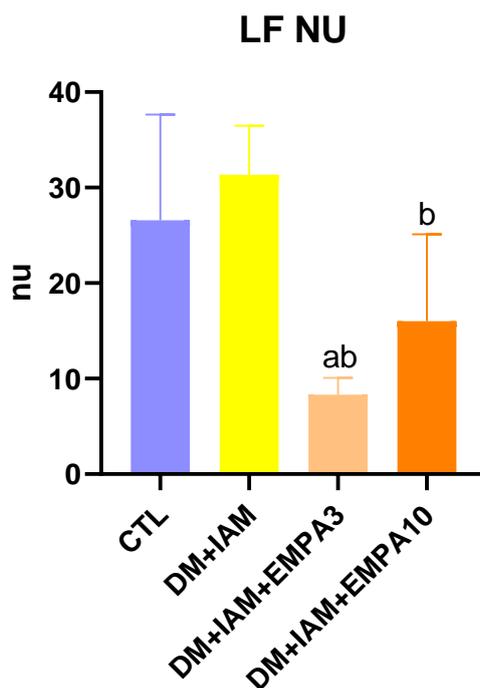


Figura 82: Modulação de baixa frequência normalizada do intervalo de pulso dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM

A modulação de alta frequência do intervalo de pulso normalizada apresentou-se aumentada no grupo tratado com empagliflozina na dose de 3 mg/kg em relação aos grupos controle e DM+IAM. O tratamento com a dose de 10 mg/kg foi capaz de aumentar o parâmetro em relação ao grupo DM+IAM. (figura 83)

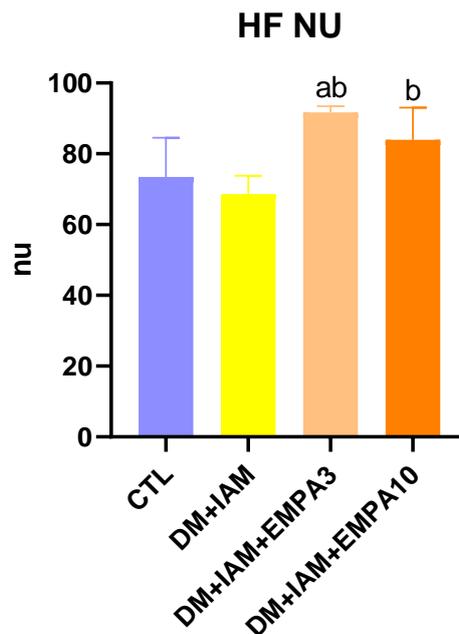


Figura 83: Modulação de alta frequência normalizada do intervalo de pulso dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM

O balanço simpato-vagal representado pelo índice LF/HF, apresentou-se reduzido no grupo DM+IAM+EMPA3 em relação aos grupos controle e DM+IAM (figura 84).

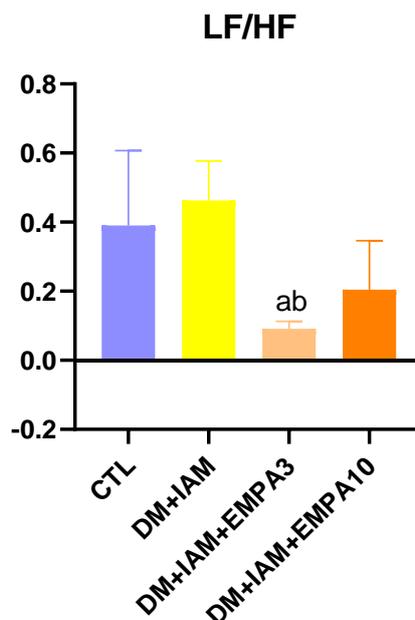


Figura 84: Balanço simpato-vagal (LF/HF) dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM

Em relação a análise simbólica da variabilidade da frequência cardíaca observou-se redução no parâmetro 0V (zero variação) no grupo DM+IAM em relação ao grupo controle (figura 85) e uma elevação do parâmetro 2V (duas variações) no grupo DM+IAM+EMPA3 em relação ao grupo controle (figura 86).

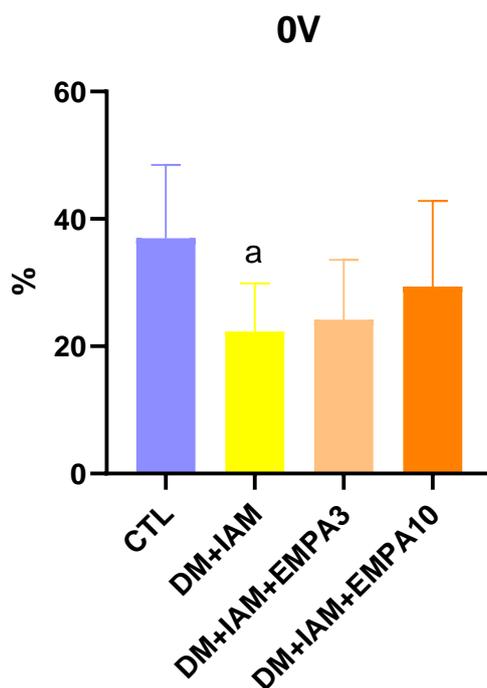


Figura 85: 0V – zero variações do intervalo de pulso pela análise simbólica, dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL

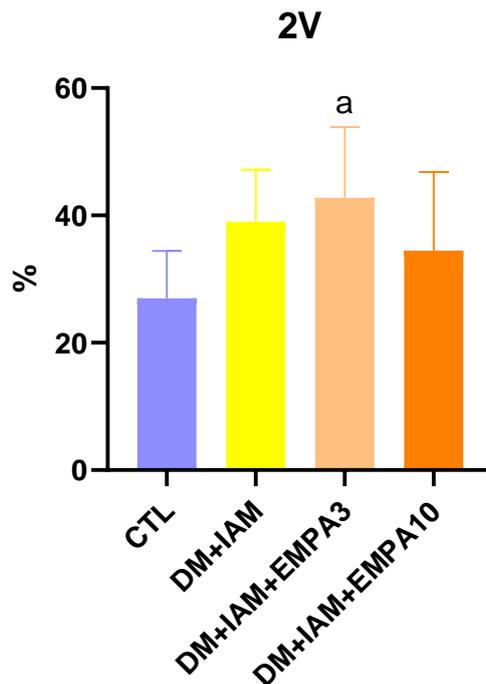


Figura 86: 2V – duas variações do intervalo de pulso pela análise simbólica, dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL

### 6.3.2.10 Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica

Em relação a análise da variabilidade da pressão arterial sistólica, conforme representado na tabela 31, notou-se redução do desvio padrão da pressão arterial sistólica (DP PAS) (figura 87) e da variância da pressão arterial sistólica (Var PAS) nos grupos DM+IAM e DM+IAM+EMPA3 em relação ao grupo controle (figura 88), o que foi normalizado com o tratamento com a dose de 10 mg/kg.

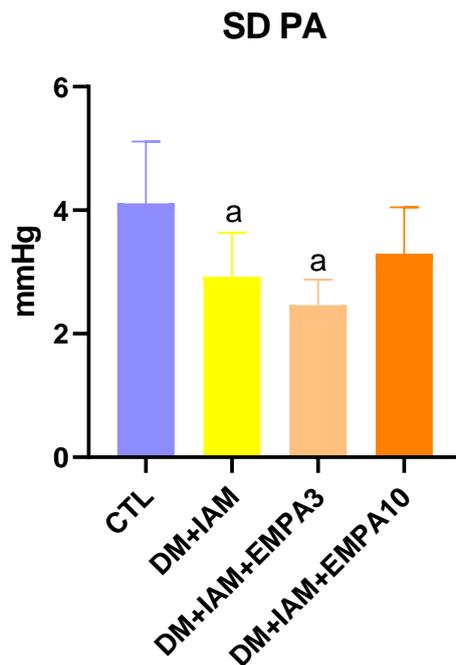


Figura 87: desvio padrão da pressão arterial sistólica dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10);  
a:  $p < 0,05$  vs CTL

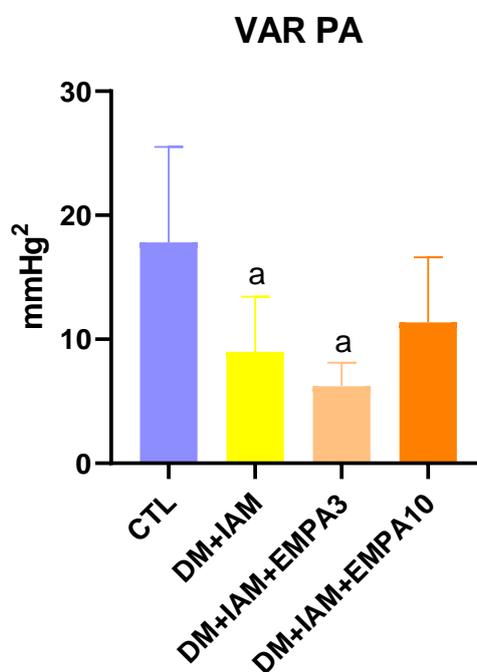


Figura 88: Variância da pressão arterial sistólica dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10);  
a:  $p < 0,05$  vs CTL

Ainda, a modulação de baixa frequência da pressão arterial sistólica (LF PAS) encontrou-se reduzida no grupo DM+IAM em relação ao grupo controle, e esta mudança foi normalizada por ambos os tratamentos com empagliflozina. (Figura 89)

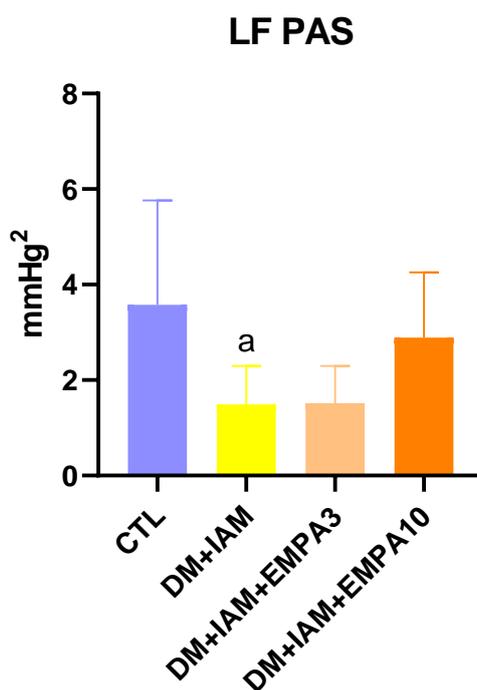


Figura 89: modulação de baixa frequência da pressão arterial sistólica dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a: p<0,05 vs CTL

Tabela 31: Índices de variabilidade da pressão arterial sistólica dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10)

	CTL	DM+IAM	DM+IAM+EMPA3	DM+IAM+EMPA10
<b>DP PAS (mmHg)</b>	4,114 ± 0,99	2,921 ± 0,71 <sup>a</sup>	2,463 ± 0,41 <sup>a</sup>	3,296 ± 0,75
<b>Var PAS (mmHg²)</b>	17,82 ± 7,68	8,98 ± 4,45 <sup>a</sup>	6,20 ± 1,90 <sup>a</sup>	11,36 ± 5,26
<b>LF PAS (mmHg²)</b>	3,579 ± 2,18	1,490 ± 0,80 <sup>a</sup>	1,517 ± 0,77	2,891 ± 1,36

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros de variabilidade da Pressão arterial sistólica. DP PAS (mmHg): Desvio Padrão da pressão arterial sistólica; Var PAS (mmHg²): Variância da pressão arterial sistólica; LF PAS: Modulação de baixa frequência da pressão arterial sistólica (mmHg²). a: p<0,05 vs CTL

### 6.3.3 Avaliação ecocardiográfica

#### 6.3.3.1 Parâmetros morfométricos

Encontram-se apresentados na tabela 32 os parâmetros ecocardiográficos morfométricos.

Tabela 32: Parâmetros ecocardiográficos morfométricos dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10)

	CTL	DM+IAM	DM+IAM+EMPA3	DM+IAM+EMPA10
<b>Aorta (mm)</b>	3,264 ± 0,28	3,488 ± 0,27	3,513 ± 0,41	3,530 ± 0,20
<b>Átrio esquerdo (mm)</b>	4,211 ± 0,53	4,285 ± 0,37	4,236 ± 0,84	3,763 ± 0,38
<b>PLVEd (mm)</b>	1,282 ± 0,29	1,270 ± 0,13	1,154 ± 0,18	1,176 ± 0,20
<b>SIVd (mm)</b>	1,060 ± 0,21	0,748 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,882 ± 0,17	0,905 ± 0,11
<b>DIVEd (mm)</b>	6,687 ± 0,98	8,336 ± 0,84 <sup>a</sup>	8,084 ± 0,65 <sup>a</sup>	7,082 ± 0,91 <sup>b</sup>
<b>DIVEs (mm)</b>	3,821 ± 1,14	6,965 ± 0,84 <sup>a</sup>	6,500 ± 0,65 <sup>a</sup>	4,636 ± 1,04 <sup>bc</sup>

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros de ecocardiográficos morfométricos; PLVEd: espessura diastólica parede livre do ventrículo esquerdo; SIVDd: espessura diastólica do septo interventricular; DIVEd: diâmetro diastólico da cavidade do ventrículo esquerdo; DIVEs: diâmetro sistólico da cavidade do ventrículo esquerdo; a: p< 0,05 vs CTL; b: <0,05 vs DM+IAM; c: p<0,05 vs DM+IAM+EMPA3

Conforme esperado pela ligadura da artéria coronária e isquemia miocárdica, notou-se redução da espessura do septo interventricular na diástole no grupo DM+IAM, porém, essa redução foi atenuada pelo tratamento por ambas as doses. O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo se apresenta aumentado nos grupos IAM e IAM+EMPA3 em relação ao grupo controle, contudo, os animais do grupo IAM+EMPA10 apresentaram atenuação desta redução (figura 90).

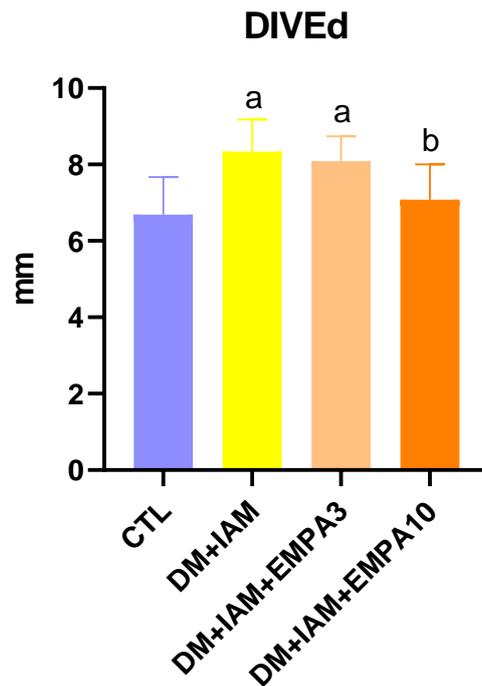


Figura 90: Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM

Ainda, notou-se aumento do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo nos grupos DM+IAM e DM+IAM+EMPA3 em relação ao grupo controle, porém, os animais do grupo DM+IAM+EMPA10 sofreram importante atenuação deste aumento, sendo os valores menores do que aqueles dos grupos DM+IAM e DM+IAM+EMPA3 (figura 91)

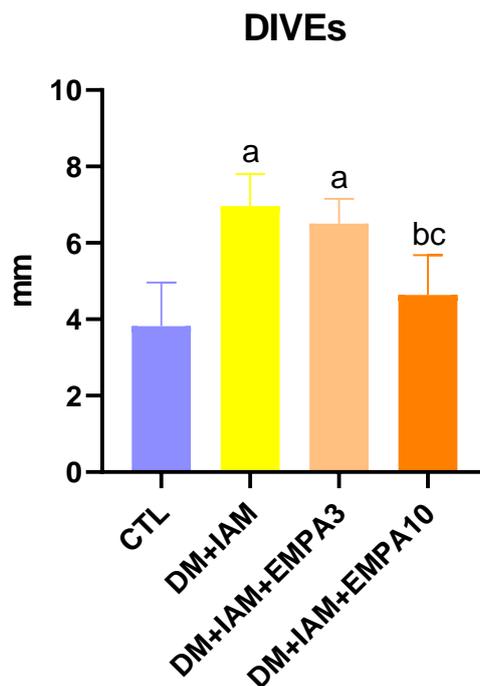


Figura 91: Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM; c:  $p < 0,05$  vs DM+IAM+EMPA3

### 6.3.3.2 Parâmetros de função sistólica

Encontram-se apresentados na tabela 33 os parâmetros ecocardiográficos relacionados a função sistólica.

Tabela 33: Parâmetros ecocardiográficos relacionados a função sistólica do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=10), DM (n=10), DM+EMPA3 (n=10) e DM+EMPA10 (n=10)

	CTL	DM+IAM	DM+IAM+EMPA3	DM+IAM+EMPA10
<b>FE VE (%)</b>	77,09 ± 8,1	27,23 ± 6,5 <sup>a</sup>	38,55 ± 7,7 <sup>ab</sup>	60,6 ± 7,4 <sup>abc</sup>
<b>FEnc VE (%)</b>	46,33 ± 10,7	13,82 ± 3,7 <sup>a</sup>	19,60 ± 4,5 <sup>a</sup>	33,74 ± 5,6 <sup>abc</sup>
<b>FAC (%)</b>	61,18 ± 5,7	23,90 ± 4,7 <sup>a</sup>	26,89 ± 8,9 <sup>a</sup>	40,91 ± 4,1 <sup>abc</sup>
<b>FE VE long (%)</b>	50,91 ± 8,8	29,03 ± 8,6 <sup>a</sup>	28,47 ± 6,0 <sup>a</sup>	42,75 ± 6,7 <sup>bc</sup>
<b>S' (mm/s)</b>	47,79 ± 5,9	41,52 ± 7,1 <sup>a</sup>	38,27 ± 7,1 <sup>a</sup>	43,31 ± 3,2

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros ecocardiográficos relacionados a função sistólico do ventrículo esquerdo; FE VE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo calculada pelo modo M em eixo curto; FEnc VE: fração de encurtamento do ventrículo

esquerdo; FAC: mudança fracional da área da cavidade do ventrículo esquerdo; FE VE long: fração de ejeção do ventrículo esquerdo calculado pelo modo bidimensional em corte do eixo longo; S': velocidade de movimentação sistólica das fibras miocárdicas longitudinais; a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM; c:  $p < 0,05$  vs DM+IAM+EMPA3

Como esperado pelo efeito da isquemia miocárdica, pode se notar redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (figura 92), da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo e da FAC - mudança fracional da área - do ventrículo esquerdo (figura 93) em todos os grupos infartados. Porém, o tratamento com a dose de 10 mg/kg foi capaz de reverter essas reduções, tendo os animais apresentado médias de todos os parâmetros citados acima daquelas dos animais dos grupos IAM e IAM+EMPA3. Ainda, em relação a fração de ejeção, o grupo IAM+EMPA3 apresentou valores elevados em relação aqueles do grupo IAM.

Ainda, observamos redução na velocidade de movimentação das fibras longitudinais do ventrículo esquerdo na sístole, representada pela onda S', nos grupos DM+IAM e DM+IAM+EMPA3 em relação ao grupo controle. No grupo DM+IAM+EMPA10 houve atenuação desta redução

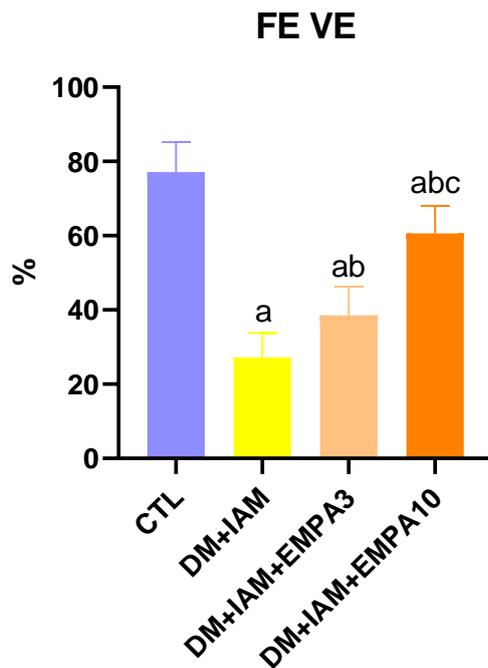


Figura 92: Fração de ejeção ventrículo esquerdo em sístole dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM; c:  $p < 0,05$  vs DM+IAM+EMPA3

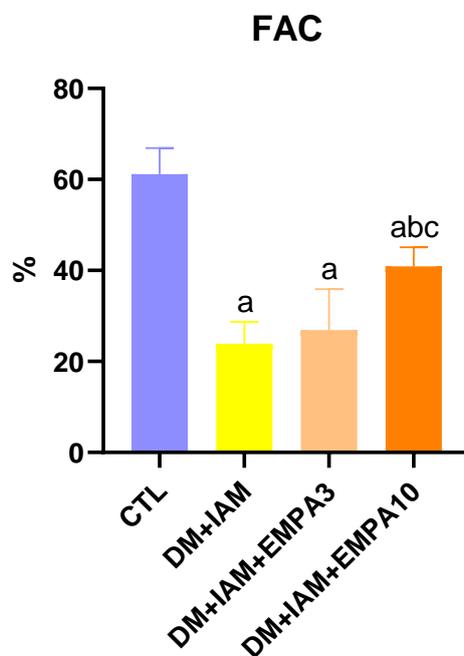


Figura 93: Mudança fracional da área do ventrículo esquerdo em sístole dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM; c:  $p < 0,05$  vs DM+IAM+EMPA3

### 6.3.3.3 Parâmetros de função diastólica

Encontram-se apresentados na tabela 34 os parâmetros ecocardiográficos relacionados a função sistólica.

Tabela 34: Parâmetros ecocardiográficos relacionados a função diastólica do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10)

	CTL	DM+IAM	DM+IAM+EMPA3	DM+IAM+EMPA10
<b>Vel. Máx. E (mm/s)</b>	1092 ± 116,5	962,1 ± 188,7	747,3 ± 127 <sup>ab</sup>	722,5 ± 96,2 <sup>ab</sup>
<b>Vel. Máx. A (mm/s)</b>	598,1 ± 103,1	467,8 ± 173,5	434,7 ± 87,0 <sup>a</sup>	525,8 ± 143,4
<b>E/A</b>	1,862 ± 0,21	2,126 ± 0,72	1,774 ± 0,41	1,496 ± 0,61 <sup>b</sup>
<b>Vel. Máx. E' (mm/s)</b>	45,02 ± 7,9	37,18 ± 12,6	48,66 ± 16,9	3520 ± 7,9
<b>Vel. Máx. A' (mm/s)</b>	55,34 ± 19,9	50,49 ± 18,2	43,88 ± 18,1	56,49 ± 13,1
<b>E'/A'</b>	0,982 ± 0,5	0,714 ± 0,1	1,345 ± 0,7 <sup>b</sup>	1,379 ± 0,3 <sup>b</sup>
<b>TRIV (ms)</b>	17,62 ± 4,0	19,16 ± 6,7	23,08 ± 6,8	23,57 ± 2,7
<b>E/E'</b>	25,05 ± 4,8	33,45 ± 8,5 <sup>a</sup>	18,91 ± 9,0 <sup>b</sup>	20,6 ± 4,6 <sup>b</sup>

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros ecocardiográficos relacionados a função diastólica do ventrículo esquerdo; Vel. Máx. E: velocidade máxima da onda E do fluxo mitral; Vel. Máx. A: velocidade máxima da onda A do fluxo mitral; E/A: relação entre as ondas E e A; Vel. Máx. E': velocidade máxima da onda E' da movimentação miocárdica; Vel. Máx. A': velocidade máxima da onda A' da movimentação miocárdica; E'/A': relação entre as ondas E' e A'; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; E/E': relação entre as ondas E e E'; a: p<0,05 vs CTL; b: p<0,05 vs DM+IAM; c: p<0,05 vs DM+IAM+EMPA3

Observamos redução significativa da relação E/A no grupo DM+IAM+EMPA10 em relação ao grupo DM+IAM. Associado a isto podemos notar uma importante elevação na relação E'A' nos grupos tratados com empagliflozina nas doses de 3 e 10 mg/kg e relação ao grupos DM+IAM (figura 94).

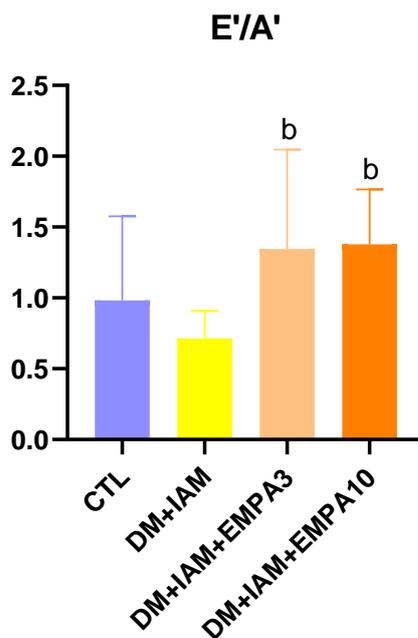


Figura 94: Relação E'/A' dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM; c:  $p < 0,05$  vs DM+IAM+EMPA3

Ainda, observamos uma elevação da relação E/E' no grupo DM+IAM em relação ao grupo controle. Ainda, esta relação se apresentou reduzida nos grupos DM+IAM+EMPA3 e DM+IAM+EMPA10 em relação ao grupo DM+IAM (figura 95).

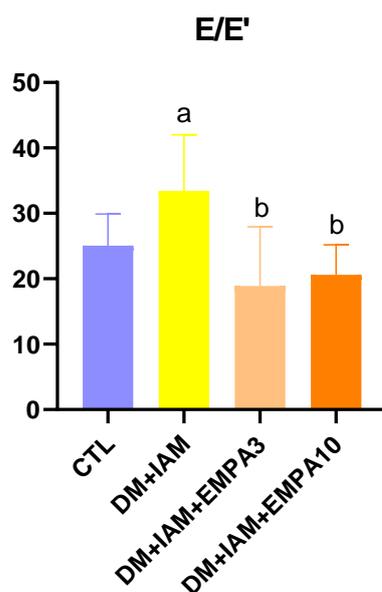


Figura 95: Relação E/E' dos animais dos grupos CTL (n=10), DM+IAM (n=10), DM+IAM+EMPA3 (n=10) e DM+IAM+EMPA10 (n=10); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM

### 6.3.4 Quantificação do colágeno em tecido cardíaco

As áreas totais dos ventrículos esquerdos e direitos não apresentaram diferença entre os grupos estudados. (Tabela 35)

Contudo, houve aumento da porcentagem de colágeno total nos ventrículo esquerdo no grupo DM+IAM e DM+IAM+EMPA3 em relação ao grupo controle, o que normalizou-se com o tratamento com a dose de 10 mg/kg de empagliflozina (figuras 96 e 97).

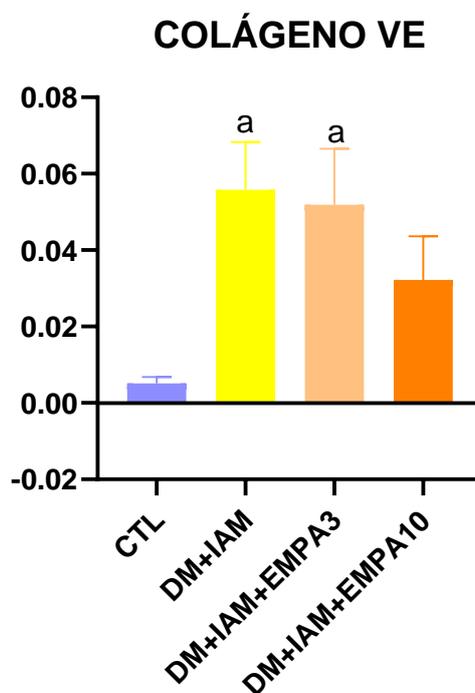


Figura 96: Colágeno total do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM+IAM (n=6), DM+IAM+EMPA3 (n=6) e DM+IAM+EMPA10 (n=6);  
a:  $p < 0,05$  vs CTL

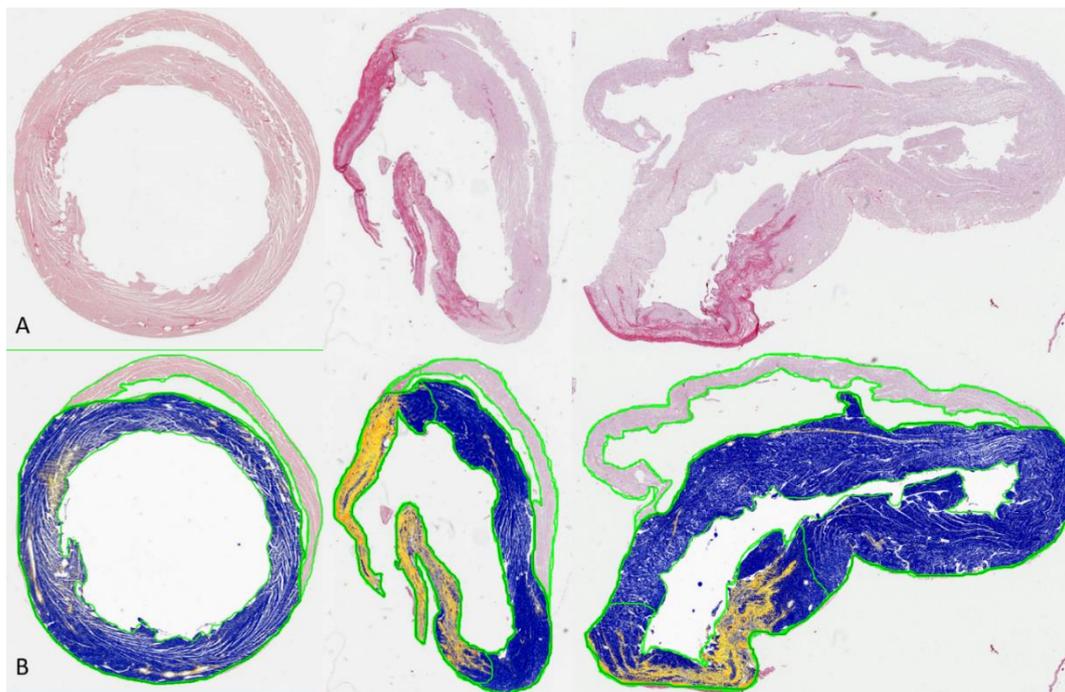


Figura 97: Figura representativa dos cortes histológicos na linha A e das áreas totais de tecido ventricular esquerdo (azul) e colágeno (amarelo), respectivamente nos grupos CTL, DM+IAM e DM+IAM+EMPA10

Adicionalmente, notou-se redução da porcentagem de colágeno no ventrículo direito no grupo diabéticos infartado e tratado com a dose de 10 mg/kg de empagliflozina em relação ao grupo CTL (figura 98).

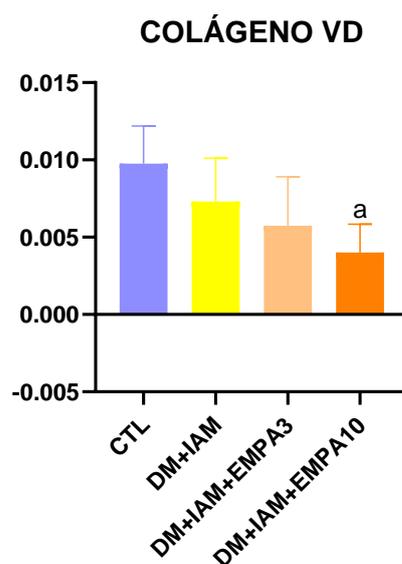


Figura 98: Colágeno total do ventrículo direito dos animais dos grupos CTL (n=6), DM+IAM (n=6), DM+IAM+EMPA3 (n=6) e DM+IAM+EMPA10 (n=6);  
a:  $p < 0,05$  vs CTL

Tabela 35: Avaliação histológica dos ventrículos esquerdo e direito dos animais dos grupos CTL (n=6), DM+IAM (n=6), DM+IAM+EMPA3 (n=6) e DM+IAM+EMPA10 (n=6)

	CTL	DM+IAM	DM+IAM+EMPA3	DM+IAM+EMPA10
Área total do VE (mm <sup>2</sup> )	62,89 ± 16,2	56,09 ± 21,3	83,18 ± 27,3	64,83 ± 9,8
% colágeno VE	0,5089 ± 0,1	5,577 ± 1,2 <sup>a</sup>	5,186 ± 1,4 <sup>a</sup>	3,224 ± 1,1
% colágeno VE/mm <sup>2</sup>	0,3262 ± 12,4	2,966 ± 0,7 <sup>a</sup>	4,306 ± 1,9 <sup>a</sup>	2,131 ± 0,89
Área total VD	7,43 ± 1,5	12,22 ± 3,2	10,71 ± 3,5	8,39 ± 1,4
% colágeno VD	0,9764 ± 0,2	0,7314 ± 0,2	0,5748 ± 0,3	0,4012 ± 0,1 <sup>a</sup>

Tabela representativa das médias ± desvio padrão; a: p<0,05 vs CTL

### 6.3.5 Expressão de proteínas cardíacas

#### 6.3.5.1 Expressão de proteínas envolvidas na regulação intracelular do cálcio

As proteínas avaliadas encontram-se apresentadas na tabela 36.

Notou-se um redução da relação fosfolambam fosforilado/ fosfolambam total nos grupos DM+IAM e DM+IAM+EMPA10 em relação ao grupo CTL (Figura 99).

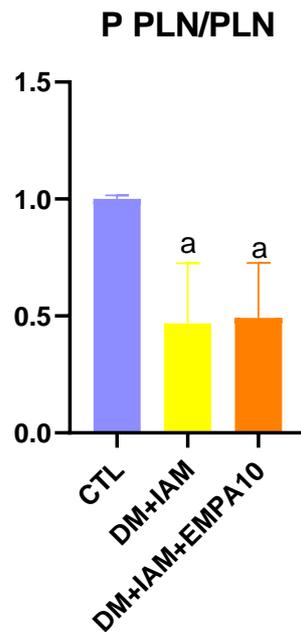


Figura 99: Relação fosfolambam fosforilada/fosfolambam total no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM+IAM (n=6), DM+IAM+EMPA3 (n=106 e DM+IAM+EMPA10 (n=6); a:  $p < 0,05$  vs CTL

Observou-se uma redução na expressão da SERCA2 e na relação SERCA2/fosfolambam total no grupo DM+IAM+EMPA10 versus grupo controle (figuras 100 e 101).

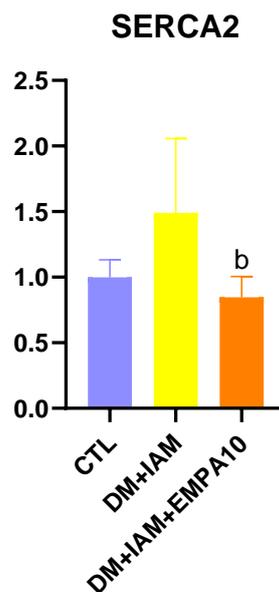


Figura 100: Expressão da SERCA2 total no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM+IAM (n=6), DM+IAM+EMPA3 (n=6) e DM+IAM+EMPA10 (n=6); b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM

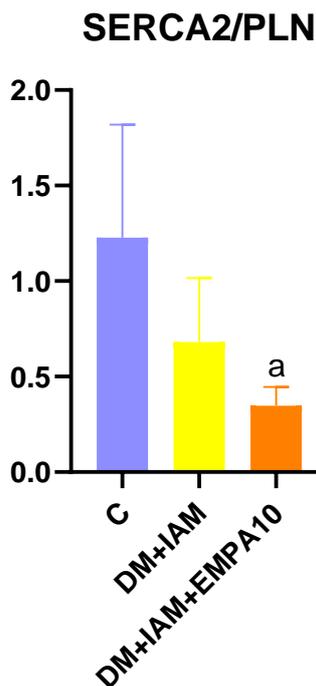


Figura 101: Relação SERCA2/fosfolambam total no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6) DM+IAM (n=6), DM+IAM+EMPA3 (n=6) e DM+IAM+EMPA10 (n=6); a: p< 0,05 vs CTL

Tabela 36: Expressão de proteínas envolvidas na recaptção de Ca<sup>2+</sup> pelo retículo sarcoplasmático do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM+IAM (n=6) e DM+IAM+EMPA10 (n=6)

	CTL	DM+IAM	DM+IAM+EMPA10
<b>PLN</b>	1,000 ± 0,50	2,854 ± 2,03	1,741 ± 1,08
<b>P PLN</b>	0,999 ± 0,49	1,190 ± 0,80	0,7475 ± 0,45
<b>P PLN/PLN</b>	1,000 ± 0,01	0,4683 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,4920 ± 0,23 <sup>a</sup>
<b>SERCA2</b>	1,000 ± 0,13	1,490 ± 0,56	0,8461 ± 0,15 <sup>b</sup>
<b>SERCA2/PLN</b>	1,228 ± 0,59	0,6814 ± 0,33	0,3477 ± 0,09 <sup>a</sup>

Tabela representativa das médias ± desvio padrão das proteínas envolvida na recaptção de Ca<sup>2+</sup> - expressas em unidades de medida arbitrárias. PLN: fosfolambam; P PLN: fosfolambam fosforilado total; P PLN/PLN: relação fosfolambam fosforilado total / fosfolambam; SERCA2: ; SERCA2/PLN: relação SERCA2/fosfolambam. a: p<0,05 vs CTL; b: p<0,05 vs DM+IAM

### 6.3.5.2 Expressão de proteínas de matriz extracelular

Em relação a ERK 1/2 total, notou-se o aumento de sua expressão no grupo DM+IAM quando comparado ao grupo controle. Ainda, no grupo tratado,

estas proteínas encontraram-se reduzidas em relação ao grupo DM+IAM (figura 102, tabela 37)

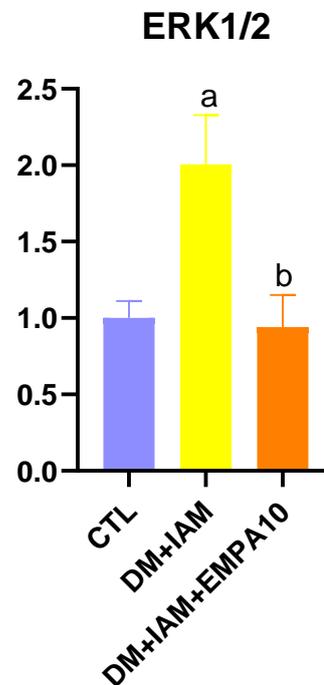


Figura 102: Expressão das proteínas de matriz extracelular ERK1/2 totais do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM+IAM (n=6) e DM+IAM+EMPA10 (n=6); a:  $p < 0,05$  vs CTL; b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM

A ERK 1/2 fosforilada e a relação ERK 1/2 fosforilada/ERK 1/2 total apresentou-se aumentada em ambos os grupos diabéticos e infartados independentemente de tratamento (figuras 103 e 104)

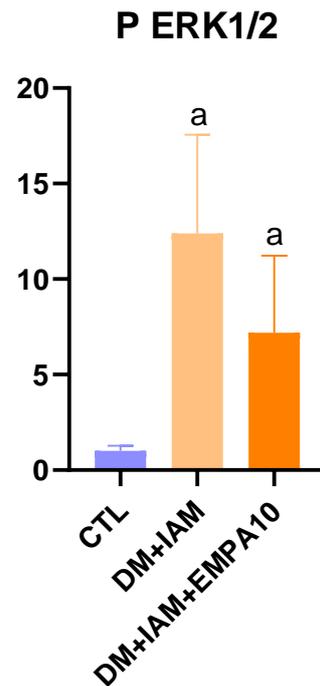


Figura 103: Expressão das proteínas de matriz extracelular ERK1/2 fosforiladas do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM+IAM (n=6) e DM+IAM+EMPA10 (n=6); a:  $p < 0,05$  vs CTL

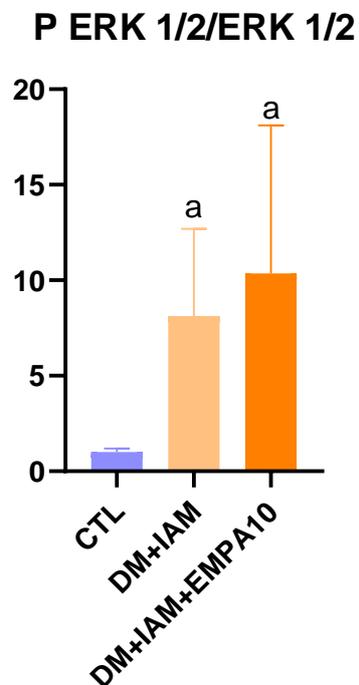


Figura 104: Relação ERK1/2 fosforilada/ERK 1/2 do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM+IAM (n=6) e DM+IAM+EMPA10 (n=6); a:  $p < 0,05$  vs CTL

Tabela 37: Expressão de proteínas de matriz extracelular dos animais dos grupos CTL (n=6), DM+IAM (n=6) e DM+IAM+EMPA10 (n=6)

	<b>CTL</b>	<b>DM+IAM</b>	<b>DM+IAM+EMPA10</b>
<b>ERK 1/2</b>	1,000 ± 0,11	2,005 ± 0,32 <sup>a</sup>	0,9407 ± 0,20 <sup>b</sup>
<b>P ERK 1/2</b>	1,000 ± 0,27	12,39 ± 5,16 <sup>a</sup>	7,190 ± 4,03 <sup>a</sup>
<b>P ERK 1/2/ ERK 1/2</b>	1,000 ± 0,18	8,126 ± 4,57 <sup>a</sup>	10,36 ± 7,7 <sup>a</sup>

Tabela representativa das médias ± desvio padrão; a: p<0,05 vs CTL; b: p<0,05 vs DM+IAM

### 6.3.6 Estresse oxidativo

Estão apresentadas na tabela 38 as medidas de estresse oxidativo dos grupos CTL, DM+IAM e DM+IAM+EMPA10.

Tabela 38: Parâmetros de estresse oxidativo no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM+IAM (n=6) e DM+IAM+EMPA10 (n=6)

	<b>CTL</b>	<b>DM+IAM</b>	<b>DM+IAM+EMPA10</b>
<b>Carbonilas</b>	8,610 ± 1,08	9,410 ± 1,12	8,788 ± 1,45
<b>Peróxido</b>	2,882 ± 0,37	2,972 ± 0,34	3,017 ± 0,64
<b>NADPH oxidase</b>	0,2050 ± 0,03	0,2645 ± 0,07	0,1897 ± 0,06
<b>CAT</b>	0,9717 ± 0,17	0,7025 ± 0,41	1,252 ± 0,32 <sup>b</sup>
<b>SOD</b>	13,94 ± 0,91	12,84 ± 1,49	16,30 ± 1,90 <sup>ab</sup>
<b>FRAP</b>	0,6716 ± 0,14	0,5423 ± 0,13	0,8520 ± 0,12 <sup>ab</sup>
<b>Nitrito</b>	1,594 ± 0,54	1,164 ± 0,15	1,696 ± 0,30 <sup>b</sup>

Tabela representativa das médias ± desvio padrão da média dos parâmetros de estresse oxidativo; a: p<0,05 vs CTL; b: p<0,05 vs DM+IAM

Em relação a CAT, notou-se seu aumento no grupo DM+IAM+EMPA10 em relação ao grupo DM+IAM. (Figura 105).

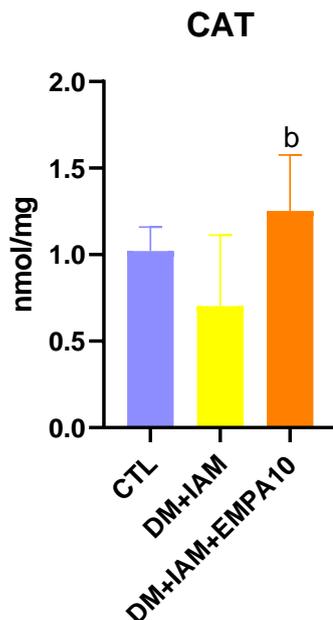


Figura 105: Expressão da enzima antioxidante catalase no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM+IAM (n=6) e DM+IAM+EMPA10 (n=6); b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM

A SOD apresentou-se aumentada no grupo DM+IAM+EMPA10 quando comparada com os grupos controle e DM+IAM (Figura 106).

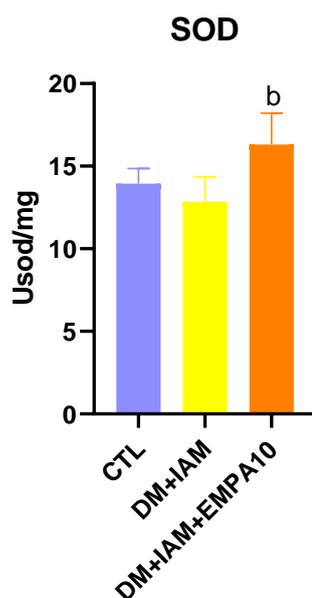


Figura 106: Expressão da enzima antioxidante superóxido dismutase no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM+IAM (n=6) e DM+IAM+EMPA10 (n=6); b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM

O nitrito apresentou-se aumentado no grupo DM+IAM+EMPA10 quando comparado ao grupo DM+IAM (Figura 107).

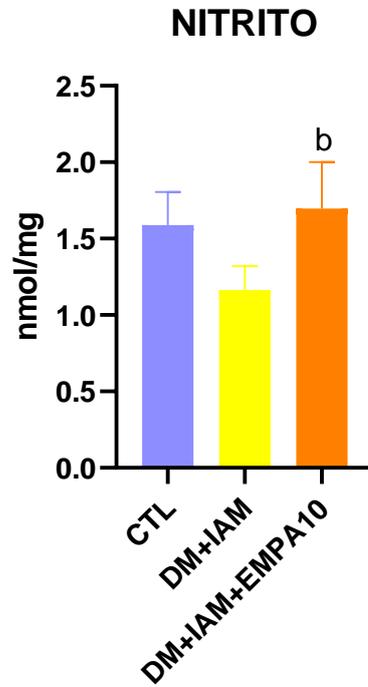


Figura 107: Expressão do nitrito no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CTL (n=6), DM+IAM (n=6) e DM+IAM+EMPA10 (n=6); b:  $p < 0,05$  vs DM+IAM

## 7 Discussão

### 7.1 Efeitos da empagliflozina sobre o diabetes mellitus

Para se testar o efeito protetor do miocárdio pela empagliflozina em ratos diabéticos, foram comparados animais dos grupos controle, diabéticos (DM) e diabéticos tratados com diferentes doses de empagliflozina: 3 mg/kg (DM+EMPA3) e 10 mg/kg (DM+EMPA10). Foram realizadas avaliações metabólicas, hemodinâmicas, ecocardiográficas, histológicas, de expressões de proteínas relacionadas ao manejo do cálcio intracelular e de matriz extracelular e o estresse oxidativo.

Como esperado, comprovando o sucesso de um protocolo já há muito conhecido, pela utilização de estreptozotocina para a indução do diabetes(50,51), gerando prejuízos metabólicos, se observou aumento da glicemia dos animais associada ao aumento dos triglicerídeos e perda de peso. Sabidamente, a estreptozotocina é capaz de provocar destruição das células beta pancreáticas, tendo severo papel diabetogênico. Foi observado aumento severo da glicemia nos animais dos grupos diabéticos em relação ao grupo controle, conforme amplamente descrito(19,21,52,53). Contudo, devido a sua ação nos SGLT2 renais, aumentando a excreção de glicose pela urina, o tratamento com empagliflozina apenas em sua dose mais alta, foi eficaz em atenuar a elevação da glicose sérica em relação ao grupo não tratado(54).

Acompanhando os achados relacionados ao prejuízo metabólico, assim como em relação a glicemia, houve aumento significativo dos triglicerídeos nos grupos diabéticos em relação ao grupo controle ao final do protocolo devido as alterações metabólicas significativas promovidas pela estreptozotocina(50). Tal elevação não foi prevenida pelo tratamento.

Houve aumento de peso nos animais do grupo controle, ao passo que nos animais diabéticos, houve redução de peso significativa, não tendo sido o tratamento com empagliflozina capaz de atenuar tal fato.

Diversos estudos do nosso grupo têm demonstrado repetidamente, redução da pressão arterial e da frequência cardíaca em animais diabéticos(21,52,53,55). De fato, pudemos demonstrar redução da pressão arterial sistólica e da pressão de pulso nos grupos diabéticos, não sendo o tratamento capaz de prevenir tal redução. Também foi demonstrada redução da pressão arterial diastólica no grupo DM, todavia, esta redução foi prevenida pelo tratamento com ambas as doses de empagliflozina.

Sabidamente, a pressão arterial sistólica está diretamente relacionada ao trabalho cardíaco(56), sendo assim, esta redução da pressão arterial poderia se relacionar com uma disfunção sistólica ventricular, o que de fato foi demonstrado através da avaliação ecocardiográfica desses animais onde se observou redução das frações de ejeção e de encurtamento do ventrículo esquerdo. Sabemos ainda, que a pressão arterial se relaciona diretamente ao débito cardíaco, portanto, os efeitos cronotrópico e inotrópico negativos provocados pela estreptozotocina, poderiam ainda se associar contribuindo para essa redução da pressão arterial em animais diabéticos(57).

Animais diabéticos apresentam redução de volume secundária a hiperglicemia e consequente diurese osmótica (reduzindo significativamente o débito cardíaco), fato que potencialmente pode colaborar com a redução da pressão arterial.(58–60) Este fato não parece, em nosso estudo, estar relacionado a essa redução da pressão arterial, visto que o tratamento com inibidores do SGLT2 também possui papel importante no aumento da diurese osmótica(28,61), o que não promoveu maior queda da pressão arterial nos animais tratados.

O diabetes mellitus, sabidamente, é capaz de promover uma neuropatia autonômica(62,63). Diversos estudos de nosso grupo(19–21,52,53,57) têm demonstrado redução na sensibilidade barorreflexa, na variabilidade da frequência cardíaca e no tônus vagal cardíaco em animais diabéticos. Ainda, se sabe que em paciente diabéticos, uma piora da atividade reflexa autonômica eleva a mortalidade destes pacientes(64). Portanto, no presente estudo foram avaliadas as variabilidades da frequência cardíaca e da pressão arterial sistólica e a sensibilidade barorreflexa dos animais.

Pacientes diabéticos, frequentemente apresentam redução na habilidade de regulação da frequência cardíaca, secundária a dessensibilização barorreflexa e a disfunção parassimpática. Estas alterações podem reduzir a variabilidade da frequência cardíaca. Apesar de na literatura ser amplamente demonstrado em pacientes e de forma experimental, uma redução de parâmetros de variabilidade da frequência cardíaca(64–66), o presente estudo foi apenas capaz de demonstrar uma redução da frequência cardíaca média dos animais diabéticos (redução esta atenuada pelo tratamento em ambas as doses), sem contudo haver alterações significativas em diversos parâmetros de variabilidade da frequência cardíaca. Contudo, sabe-se que a duração do diabetes está relacionada a esta disfunção, fato que poderia justificar os achados do presente estudo.

A atividade simpática em pacientes com doença cardiovascular e/ou diabéticos, pode estar associada a aumento, redução, ou ainda não apresentar alterações nas bandas de baixa frequência (LF) do intervalo de pulso e da pressão arterial. Porém, é muito descrito na literatura uma redução de componentes oscilatórios das bandas de baixa e alta frequência do intervalo de pulso e da pressão arterial(67,68), o que vem de encontro ao achado deste estudo, que demonstrou redução da banda de baixa frequência da pressão arterial (LF PAS) nos animais do grupo DM em relação ao grupo controle, o que foi revertido pelos tratamentos com ambas as doses de empagliflozina.

Conforme já descrito na literatura, curtos períodos de duração de diabetes em protocolos induzidos por estreptozotocina, já são capazes de promover danos no controle barorreflexo de animais diabéticos(69). Assim como já descrito, pudemos observar redução na bradicardia reflexa nos animais diabéticos quando comparados ao grupo controle, contudo, não se notou essa alteração em animais tratados com a dose de 3 mg/kg e ainda, houve melhora do parâmetro no grupo tratado com a dose de 10 mg/kg. Entretanto, não foi notado tal comportamento em relação a taquicardia reflexa, que não se mostrou reduzida no grupo DM e se apresentou melhorada no grupo tratado com a dose de 3 mg/kg.

A avaliação ecocardiográfica em animais de experimentação é realizada de rotina como um método não invasivo de avaliações morfológica e funcional do coração. Desta forma, utilizamos desta técnica para investigar possíveis alterações na morfologia e função cardíaca que pudessem se relacionar ao diabetes e/ou ao tratamento.

A técnica de indução do diabetes com uso de estreptozotocina tem sido frequentemente associada a disfunção ventricular sistólica (contratilidade reduzida) e diastólica (redução da complacência ventricular)(19,21,57). Neste estudo, foi demonstrada redução das função sistólica dos animais diabéticos, representada pelas diminuições nas frações de ejeção e encurtamento do ventrículo esquerdo. Ainda, foi observada alteração na função diastólica pela associação de duas variáveis bastante clássicas na classificação da função diastólica: relação E/A (reduzida nos grupos diabéticos em relação ao grupo controle) e relação E'/A' (reduzida no grupo DM em relação ao grupo controle).

A redução na fração de ejeção, embora ainda presente quando comparada ao grupo controle, foi significativamente atenuada pelo tratamento com ambas as doses de empagliflozina, porém o tratamento com a dose de 10 mg/kg se mostrou mais eficaz na atenuação desta disfunção do que aquele com a dose de 3 mg/kg. Em relação a disfunção diastólica, o tratamento com a dose de 10 mg/kg se mostrou eficaz na elevação da relação E'/A' para os valores da normalidade, prevenindo que a doença provocasse disfunção diastólica no grupo referido. Adicionalmente, notamos menor diâmetro do átrio esquerdo nos animais do grupo diabético tratado com empagliflozina 10 mg/kg em relação ao grupo diabético, sugerindo uma redução da pré carga nestes animais.

Ainda foram avaliadas histologicamente as áreas totais dos ventrículo esquerdo e direito, assim como a área total de colágeno nestas regiões. Como já descrito, animais diabéticos podem apresentar maior deposição de colágeno no tecido cardíaco(21,23,55,70–72), fato este que colaboraria no surgimento de alteração da complacência ventricular e finalmente insuficiência cardíaca. Neste estudo, foi avaliada a região total de colágeno, sem contudo, diferenciar os tipos de colágeno envolvidos neste processo. Pudemos observar que as áreas de tecido tanto do ventrículo esquerdo como do direito, não se modificaram nos animais

diabéticos em relação ao controle e ainda, não foi modificada pelos tratamentos. Porém, se pode observar uma redução da área de colágeno nos ventrículos esquerdo e direito, sendo esta redução atenuada pelo tratamento com ambas as doses de empagliflozina. Este achado se mostra contrário aqueles apresentados pela literatura, porém os trabalhos relacionados a deposição de colágeno são em sua maioria realizados com um período maior de diabetes do que o utilizado no presente estudo. Como já publicado por diversas vezes pelo nosso grupo, diversas variáveis funcionais e estruturais evidenciam possível atenuação no curto prazo destes animais, sendo assim, atribuímos a estes achados a menor deposição do colágeno neste período curto de duração do diabetes.

Diversas proteínas intracelulares associadas ao manejo do cálcio, estão relacionadas com a função cardíaca (sistólica e diastólica), dentre elas podemos citar a fosfolambam (total e fosforilada) e a SERCA2(73), que foram avaliadas no presente estudo, além de outras como os trocadores de sódio e cálcio. No presente estudo, observamos uma redução da relação fosfolambam fosforilada/fosfolambam total nos animais diabéticos, sendo esta diminuição atenuada pelo tratamento com empagliflozina. Contudo, não observamos alterações na expressão da SERCA2 e na relação SERCA2/fosfolambam, demonstrando que possivelmente a atividade destas proteínas não foi alterada apesar do aumento de sua expressão. Pudemos neste estudo avaliar a expressão destas proteínas, sem contudo, avaliar a expressão de outras proteínas relacionadas ao manejo do cálcio, além disso, o estudo do transiente de cálcio poderia demonstrar com muito mais clareza tais alterações.

Outras proteínas de matriz extracelular, como a ERK 1 e 2 são relacionados ao estímulo para o desenvolvimento de hipertrofia e também estão de certa forma relacionadas ao estímulo na deposição de colágeno no tecido cardíaco(74,75). Pudemos observar uma elevação na expressão das ERK1/2 totais no tecido cardíaco nos animais diabéticos (independente do tratamento) em relação ao grupo controle, e ainda, uma elevação das ERK 1/2 totais e da relação ERK1/2 fosforilada/ERK 1/2 total no grupo tratado em relação ao grupos controle e diabético. Contudo, apesar destas elevações, não foram observadas ecocardiograficamente e histologicamente alterações que pudessem ser justificadas pelo aumento da expressão de tais proteínas.

O estresse oxidativo está intimamente relacionado a alterações morfofuncionais do tecido cardíaco em animais diabéticos(24,70,76–78). Para tal elucidação, neste trabalho foram avaliadas a expressão de substâncias pró oxidantes e antioxidantes no ventrículo esquerdo. Com isso, não observamos aumento da expressão dos pró oxidantes (carbonilas, peróxido e NADPH oxidase) nos animais que sofreram qualquer tipo de intervenção (DM ou tratamento). Em relação aos antioxidantes, notamos uma redução na expressão do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) no grupo diabético em relação ao grupo controle e sua elevação no grupo tratado em relação ao grupo diabético. Tal achado, nos sugere que a defesa antioxidante no tecido cardíaco dos animais diabéticos esteja comprometida, sendo o tratamento capaz de proteger o tecido cardíaco do surgimento de tal redução.

## **7.2 Efeitos da empagliflozina sobre o infarto agudo do miocárdio**

Para se testar o efeito protetor do miocárdio pela empagliflozina em ratos normoglicêmicos e submetidos ao infarto agudo do miocárdio, foram comparados animais dos grupos controle, infartado (IAM) e infartados tratados com diferentes doses de empagliflozina: 3 mg/kg (IAM+EMPA3) e 10 mg/kg (IAM+EMPA10). Foram realizadas avaliações metabólicas, hemodinâmicas, ecocardiográficas, histológicas, de expressões de proteínas relacionadas ao manejo do cálcio intracelular e de matriz extracelular e o estresse oxidativo.

No presente estudo, o IAM induzido por oclusão das coronárias levou, ao final do período de protocolo, à redução do peso corporal, sem alteração da glicemia e dos triglicérides em comparação ao grupo controle. Cabe ressaltar que o tratamento com a empagliflozina na dose de 10 mg/Kg/dia/14 dias impediu essa queda de peso, mantendo o grupo IAM+EMPA 10 semelhante ao controle. Com relação aos parâmetros hemodinâmicos, conforme esperado, identificamos queda da PAS no grupo IAM, resultado esse que foi abolido nos animais infartados tratados, independente da dose de empagliflozina utilizada. Isso indica que o tratamento provavelmente impediu a queda da PA associada ao prejuízo da bomba cardíaca induzido pela isquemia.

Resultados semelhantes foram observados em relação a PAD, PAM e pressão de pulso, enquanto não se observou modificações da FC em nenhum grupo.

Já há muito se conhece que o IAM está associado à queda da PA, tanto em seres humanos (Grassi & Mancia, 1994)(79) quanto em modelos experimentais. Aires et al, (2017) observaram hipotensão em ratos avaliados após IAM, sendo este achado também observada por Mostarda et al (2014) (73) com até 90 dias pós-IM.. Outros autores observaram previamente, taquicardia e hipotensão nos animais com 1 e 10 dias após IAM(80), e, também em nosso laboratório, De Angelis et al. 2001(81) demonstraram reduzida PA e FC em animais com 8 semanas de IM. No presente trabalho, as avaliações hemodinâmicas realizadas após 15 dias de IM mostraram redução da PAS e manutenção da FC no grupo IAM quando comparado ao grupo CTL.

Essa queda na pressão arterial poderia ser atribuída a algum grau de comprometimento do coração como bomba após isquemia e conseqüentemente com redução do débito cardíaco.

De forma interessante, o tratamento com a empaglifozina preveniu essa queda de PA nos grupos infartados embora não de forma unânime. Além disso, a pressão de pulso também ficou em valores semelhantes aos encontrados no grupo controle. Reconhecendo que os inibidores dos co transportadores SGLT2 tem efeitos hipotensores associados à diurese osmótica (ref) como explicar que a PA não cai e, ao contrário, se mantém dentro dos valores controle. É possível que nesse caso, não tenha havido lesão suficiente no coração que justificasse a sua disfunção como bomba. Nesse sentido vale lembrar a diminuição de deposição de colágeno nos animais tratados com EMPA, no presente estudo, que reforça a ideia de menor remodelamento nesses grupos. De fato, vários outros achados parecem corroborar para a proteção da lesão cardíaca nos grupos tratados, em geral, em ambas as doses utilizadas. Ao analisar os parâmetros morfométricos cardíacos, fica evidente que a espessura diastólica do septo bem como o diâmetro sistólico do VE apresentam-se de forma semelhante aos valores do animal intacto, indicando que o tratamento com EMPA preveniu as alterações

observadas nesses parâmetros nos animais infartados, pelo menos na dose de 10 mg/Kg/dia/15 dias. Ressalte-se, novamente, que o tratamento iniciou no primeiro dia do IAM e que a função sistólica (expressa por fração de ejeção, fração de encurtamento e FAC) dos animais tratados com essa dose, embora ainda menor que a dos animais intactos, foi maior que a dos animais IAM e também daqueles tratados com a dose de 3 mg/Kg/dia/15 dias. Esse dados dão suporte a ideia de cardioproteção pelo menos, de forma parcial, atenuando os efeitos deletérios observados na função sistólica nos animais que sofreram oclusão coronariana e não foram tratados com a dose de 10 mg/Kg.

De forma similar, a função diastólica do VE avaliada pelo dopler tecidual E'/A' (e não pela relação E/A) foi mantida nos animais IAM+EMPA 10 e aqui também, não foi diferente do animal intacto no grupo IAM+EMPA 3. Esse achados corroboram os resultados de três grandes estudos clínicos: EMPA-REG Outcome, CANVAS e DECLARE TIMI 18(34,82,83), que examinaram a segurança e a eficácia dos inibidores SGLT2 empaglifozina, canaglifozina e dapaglifozina, respectivamente, e que sugerem que esses inibidores previnem a insuficiência cardíaca. Na sequência o estudo DAPA HF(84) demonstrou redução de hospitalização por insuficiência cardíaca e morte cardiovascular independentemente do estado glicêmico sugerindo que esses agentes poderiam ser usados para o tratamento da Insuficiência cardíaca.

Os benefícios do uso das glicozinas nesses pacientes fica claro e os achados do presente estudo avançam no sentido de mostrar que o uso precoce dessas substâncias pode, de fato, prevenir a disfunção cardíaca induzida pelo IAM.

A grande questão, ainda não bem respondida é por qual ou quais mecanismos os inibidores dos SGLT2 podem proteger o coração infartado de evoluir para a insuficiência cardíaca?

A primeira resposta que todos imaginam seria pela redução da pré e 'pós carga, considerando a diurese osmótica associada ao uso desses inibidores. E de fato, são bem conhecidos os efeitos dessa classe de drogas em reduzir o volume extracelular e com isso diminuir a carga de volume da circulação(26,27,29).No presente trabalho, observamos não só uma função sistólica melhor (embora não idêntica) no grupo tratado em comparação aos

intactos, como também uma redução do átrio esquerdo sugerindo redução da pré carga no grupo IAM+EMPA 10. Provavelmente, essa redução do átrio E e a melhora da função diastólica, tornou possível a manutenção da PA sistêmica dentro de valores controle no grupo tratamento.

Uma segunda resposta, diz respeito aos efeitos independentes da carga de volume como fontes de energia disponíveis ao miocárdio (corpos cetônicos) ou mesmo a disponibilidade maior de oxigênio frente a maior disponibilidade de hemoglobina.(85) Adicionalmente, existem evidências de modulação da atividade simpática periférica o que poderia contribuir para os efeitos protetores destes agentes farmacológico.(86) De fato, Wan e colegas sugerem que os inibidores do SGLT2 diminuem a PA ao normalizar os ritmos circadianos da PA e do SNA, o que pode ser a fonte dos seus efeitos benéficos no resultado CV em pacientes de alto risco.

Embora já tenha sido demonstrado melhora de função por cateterização direta cardíaca em modelo de infarto tratado com empaglifozina, Connelly e colaboradores (2020)(85) não conseguiram detectar melhora da fração de encurtamento pelo eco nesses mesmos animais. Essa diferença provavelmente se deve ao fato que este tipo de cateterização (condutância) permite acessar o desempenho cardíaco independente das condições de carga de volume levando os autores a concluir que os benefício se devem mais aos efeitos independentes da carga de volume. Em nosso estudo os animais passaram a receber o tratamento com EMPA já no primeiro dia de infarto, diferentemente do estudo de Connelly que iniciou o tratamento uma semana depois do infarto e tratou com dose de 20 mg/kg/ 6 semanas. Dessa forma, os efeitos do tratamento em nosso estudo são diferentes e a melhora da função sistólica no grupo tratado foi observada no ecocardiograma, através de vários parâmetros. Não se pode excluir a participação da carga de volume nessa melhora, mas os dados analisados de colágeno cardíaco mostram inequivocamente valores muito reduzidos nos grupos tratados em comparação ao grupo IAM, indicando adaptações da estrutura cardíaca ao tratamento e à isquemia.

Considerando ainda a redução da expressão da ERK  $\frac{1}{2}$  e da P ERK  $\frac{1}{2}$  após tratamento com EMPA 10 mg, e a modulação para baixo dos valores de colágeno nesse grupo em comparação ao IAM, pode se acreditar em proteção

contra o processo de hipertrofia e remodelamento no período pós infarto. De acordo com esses dados os valores de SOD e CAT após tratamento indicam modulação das enzimas antioxidantes nesse processo, mantendo os valores de carbonilas e nitritos dentro dos valores controle.

Em adição, os dados obtidos em relação às proteínas envolvidas na regulação intracelular do cálcio, mostram aumento tanto do fosfolambam fosforilado quanto da SERCA2 no IAM e valores reduzidos dos mesmos após o tratamento de tal maneira que a relação SERCA 2/PLN não se alterou significativamente o que pode sugerir que não houve mudança no perfil dessas proteínas após o tratamento. Por outro lado, existem evidências de que o aumento da expressão de SERCA (semelhante ao que vimos nos animais IAM) confere precisamente resistência a danos microvasculares no coração pós-isquêmico. De fato, em comparação com os cardiomiócitos, a lesão microvascular de isquemia/reperfusão (I/R) é um tema negligenciado no estudo da lesão de I/R cardíaca porque pouca atenção tem sido dada aos detalhes moleculares da disfunção endotelial mediada pela reperfusão. No entanto, tem se destacado a importância funcional do dano microvascular, considerado um fator de risco independente que prediz mortalidade hospitalar e eventos cardiovasculares adversos maiores em um ano.(87)

Dessa forma, o trabalho de Li e colegas(88) demonstram que a superexpressão de SERCA confere precisamente resistência a danos microvasculares no coração pós-isquêmico. Além disso, modificar a atividade, expressão ou inibição da SERCA das vias cálcio/MCU/mPTP seria a abordagem ideal para proteger a microcirculação cardíaca contra lesões de I/R. SERCA é uma bomba de cálcio que transporta cálcio intracelular para o RE. A atividade e expressão da SERCA são vitais para sustentar a linha de base ou o cálcio intracelular em repouso. O aumento da SERCA 2 no grupo IAM, poderia estar associado com essa proteção à microcirculação, especialmente porque o tecido utilizado para essas medidas foi coletado de uma área remota à isquemia, onde provavelmente o fluxo sanguíneo e a perfusão foram mantidos.

Em outras palavras, na área remota, que ainda recebe fluxo sanguíneo adequado, pode haver um aumento na atividade da SERCA2 à medida que o coração tenta compensar a perda de função na área infartada. Esse aumento

pode ajudar a manter o manuseio normal do cálcio e a função contrátil nas regiões não infartadas do coração.

Digno de nota, em relação aos benefícios do tratamento com a empaglifozina, neste estudo, é o aumento da resposta bradicárdica nas duas doses de tratamento com relação ao reduzido índice de bradicardia reflexa observado nos animais pós infarto. De forma semelhante, a taquicardia reflexa em resposta a queda da PA induzida por nitroprussiato de sódio mostra também uma resposta maior no grupo IAM+EMPA 3 com relação ao grupo IAM e uma resposta maior ainda no grupo IAM+EMPA 10 quando comparada ao grupo somente infartado e infartado tratado com EMPA na dose 3 mg/Kg. O aumento da resposta reflexa confere um valor de proteção aos grupos infartados tratados, conforme repetidamente demonstrado em estudos clínicos pós evento cardíaco por La Rovere e colegas, desde seu primeiro trabalho em que índices mais elevados de eficiência desse mecanismo reflexo de controle da circulação foram associados com maior sobrevida independente da fração de ejeção. (66,89)

Saliente-se o fato de que a sensibilidade aumentada desse reflexo tem sido relacionada com aumento da variabilidade da FC, outro elemento de proteção e sobrevida pós evento cardíaco. (90,91)

De fato, em nosso estudo observamos um aumento da variabilidade da FC e da potência total no grupo IAM+EMPA 10, acompanhados de valores das bandas normalizadas de baixa e alta frequência semelhante ao grupo controle. Em trabalhos anteriores de nosso grupo com o modelo de oclusão da artéria coronária observamos que o manejo terapêutico dos animais infartados pela atividade física por exemplo, repercutiu favoravelmente no baroreflexo e na variabilidade da FC desses animais.(92,93)

### **7.3 Efeitos da empagliflozina sobre o infarto agudo do miocárdio em animais diabéticos**

Para se testar o efeito protetor do miocárdio pela empagliflozina em ratos diabéticos e submetidos ao infarto agudo do miocárdio, foram comparados

animais dos grupos controle, diabéticos infartados (DM+IAM) e diabéticos, infartados e tratados com diferentes doses de empagliflozina: 3 mg/kg (DM+IAM+EMPA3) e 10 mg/kg (DM+IAM+EMPA10). Foram realizadas avaliações metabólicas, hemodinâmicas, ecocardiográficas, histológicas, de expressões de proteínas relacionadas ao manejo do cálcio intracelular e de matriz extracelular e o estresse oxidativo.

Mais uma vez, como esperado, comprovando o sucesso do protocolo de indução do diabetes mellitus(52,57,69) com a utilização de estreptozotocina, gerando prejuízos metabólicos, se observou aumento da glicemia dos animais e perda de peso, sem contudo apresentarem elevação significativa dos triglicerídeos. Foi observado severa elevação da glicemia nos animais dos grupos diabéticos em relação ao grupo controle, pela destruição das células beta pancreáticas pela estreptozotocina. Contudo, mais uma vez, devido a sua ação nos SGLT2 renais(54), aumentando a excreção de glicose pela urina, o tratamento com empagliflozina em ambas as doses, foram eficazes em atenuar a elevação da glicose sérica em relação ao grupo não tratado. Adicionalmente, o grupo tratado com a dose de 10 mg/kg foi mais eficaz neste controle glicêmico, apresentando ainda redução da glicose sérica em relação ao grupo DM+IAM+EMPA3.

Em relação ao peso corporal, assim como apresentado nos grupos apenas diabéticos, nos animais diabéticos infartados, houve redução de peso significativa, não tendo sido o tratamento com empagliflozina capaz de atenuar tal redução, ao passo que nos animais do grupo controle houve ganho de peso durante o protocolo. Esta redução provavelmente se deve a associação das alterações metabólicas promovidas pelo DM, associadas as lesões pós cirúrgicas presentes nesses animais e a redução da perfusão tecidual causada pela disfunção sistólica e redução da pressão arterial provocada pelo IAM(22,73,92). Ainda, conforme já descrito pelo nosso grupo, não parece ter havido redução adicional do peso provocada pela associação entre DM e IAM nestes animais.

Diversos estudos do nosso grupo têm demonstrado repetidamente, redução da pressão arterial e da frequência cardíaca em animais diabéticos

assim como em animais infartados(22,24,52,53,81). Foi aqui demonstrada redução das pressões arterial sistólica, diastólica e média nos grupos diabéticos e infartados, não sendo o tratamento capaz de prevenir tal redução. Também foi demonstrada redução da pressão de pulso nos grupo DM+IAM e no grupo DM+IAM+EMPA3 em relação ao grupo controle, porém, esta redução foi prevenida pelo tratamento com a dose de 10 mg/kg de empagliflozina onde os animais apresentaram elevação da pressão de pulso em relação ao grupo sem tratamento. Conforme descrito na literatura(22,40,94), não parece ter havido redução adicional das pressões artéria sistólica, diastólica, média e de pulso provocadas pela associação entre DM e IAM nestes animais. Estas reduções nas pressões nos grupos diabéticos e infartados pode ser explicada pelas alterações metabólicas e estruturais no tecido cardíaco secundárias aos dois processos patológicos aos quais os animais foram submetidos (DM e IAM), levando a disfunção sistólica e conseqüente redução das pressões, disfunção esta, que parece ser atenuada pelo tratamento com empagliflozina. Mais uma vez, em nosso estudo, a inibição dos SGLT2 não parece estar relacionado a essa redução da pressão arterial, visto que o tratamento eleva a diurese osmótica(54), o que não promoveu maior queda da pressão arterial nos animais tratados.

Encontramos com clareza na literatura, trabalhos demonstrando redução da frequência cardíaca em animais diabéticos como apresentado no capítulo 1, contudo, o comportamento da frequência no infarto agudo do miocárdio se demonstra bastante divergentes entre as publicações, levando-se ainda em conta o período pós infarto. Neste estudo, não foram observadas alterações na frequência cardíaca média dos animais diabéticos e infartados, independentemente dos tratamentos.

Conforme já discutido no capítulo 1, curtos períodos de duração de diabetes em protocolos induzidos por estreptozotocina, já são capazes de promover danos no controle barorreflexo de animais diabéticos. Dessa forma, novamente pudemos observar redução na bradicardia reflexa nos animais diabéticos infartados e nos tratados com a dose de 3 mg/kg, quando comparados ao grupo controle, contudo, o tratamento com a dose de 10 mg/kg foi capaz de prevenir tão disfunção, apresentando valores de bradicardia reflexa superiores

ao grupo DM+IAM e DM+IAM+EMPA3. Entretanto, mais uma vez, não foi notado tal comportamento em relação a taquicardia reflexa, que não se mostrou reduzida no grupo DM+IAM e se apresentou elevada no grupo tratado com a dose de 3 mg/kg, em relação aos grupos CTL, DM+IAM e DM+IAM+EMPA10.

Pacientes diabéticos, assim como infartados tendem a apresentar prejuízo na regulação da frequência cardíaca, secundária a dessensibilização barorreflexa e a disfunção parassimpática, sendo a variabilidade da frequência cardíaca um importante mecanismo controle momentâneo da frequência cardíaca(64,91). Estas alterações podem reduzir a variabilidade da frequência cardíaca e, sabidamente, a redução da sensibilidade barorreflexa e da variabilidade da frequência são fatores de aumento das taxas de mortalidade após a ocorrência do IAM. No presente estudo pudemos observar uma redução da modulação de baixa frequência do intervalo de pulso (LF) nos grupos tratados em relação ao grupo DM+IAM e ainda, normalização do LF no grupo tratado com a dose de 10 mg/kg em relação ao grupo controle. Sobre a modulação de alta frequência do intervalo de pulso (HF) observou-se o inverso, um aumento do HF nos grupos tratados em relação ao grupo DM+IAM e ainda, normalização do HF no grupo tratado com a dose de 10 mg/kg em relação ao grupo controle. O balanço simpato-vagal apresentou-se reduzida no grupo DM+IAM+EMPA3 em relação aos grupo CTL e DM+IAM, sem alterações no grupo tratado com 10 mg/kg em relação ao demais grupos. Tais achados nos sugerem um aumento da atividade simpática, provocando menor modulação do LF e conseqüentemente maior modulação do HF. Em relação a variabilidade da pressão arterial sistólica, notamos uma redução do desvio padrão e da variância da PAS nos grupos DM+IAM e DM+IAM+EMPA3 em relação ao grupo controle, redução esta que foi prevenida com o tratamento com empagliflozina na dose de 10 mg/kg. Ainda, o componente de baixa frequência da modulação da pressão arterial sistólica (LF PAS), se apresentou reduzido apenas no grupo diabético infartado (DM+IAM), sugerindo prevenção da atenuação da redução do componente de baixa frequência pelo tratamento.

A indução do diabetes, assim como a ligadura da artéria coronariana esquerda promovendo isquemia miocárdica, são associadas a disfunção ventricular sistólica (contratilidade reduzida) e diastólica (redução da

complacência ventricular) secundárias ao remodelamento cardíaco que leva a substituição do tecido miocárdico por tecido fibrótico(22,40,57). Neste estudo, foi demonstrada redução da função sistólica dos animais diabéticos e infartados, representada pelas diminuições nas frações de ejeção e de encurtamento do ventrículo esquerdo avaliadas pelo modo M em eixo curto, pela variação fracional da área de cavidade do VE e pela fração de ejeção do VE avaliada pelo modo bidimensional em eixo longo do VE, em todos os animais diabéticos e infartados. Contudo, se pode observar melhora da fração de ejeção pelo modo M no grupo tratado com dose baixa. Adicionalmente, houve importante prevenção na redução da fração de ejeção, de encurtamento e da variação fracional da área no grupo tratado com a dose de 10 mg/kg, que se apresentaram melhores do que aquelas dos animais dos grupos DM+IAM e DM+IAM+EMPA3. A onda S' avaliada pelo doppler tecidual, representando a velocidade de movimentação do músculo cardíaco durante a sístole, apresentou-se reduzida nos grupos DM+IAM e DM+IAM+EMPA3 comparados ao grupo CTL, porém, o tratamento com a dose de 10 mg/kg foi capaz de impedir tal redução, representando também, uma melhor função de contração do VE.

Em relação função diastólica do ventrículo esquerdo, foi observada redução da relação E/A no grupo DM+IAM+EMPA10 em relação ao grupo DM+IAM. Ainda, observou-se aumento da relação E'/A' nos grupos diabéticos, infartados e tratados (independentemente da dose). Tal associação nos permite dizer que houve melhora na função diastólica do VE nos grupos tratados. A relação E/E' tem sido frequentemente associada a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, esta relação se apresentou maior no grupo DM+IAM em relação ao controle, contudo, os animais dos grupos tratados (independentemente da dose), apresentaram redução desta relação quando comparados aos animais diabéticos e infartados.

A redução na fração de ejeção, embora ainda presente quando comparada ao grupo controle, foi significativamente atenuada pelo tratamento com ambas as doses de empagliflozina, porém o tratamento com a dose de 10 mg/kg se mostrou mais eficaz na atenuação desta disfunção do que aquele com a dose de 3 mg/kg. Em relação a disfunção diastólica, o tratamento com a dose de 10 mg/kg se mostrou eficaz na elevação da relação E'/A' para os valores da

normalidade, prevenindo que a doença provocasse disfunção diastólica nos grupos tratados.

Adicionalmente, em relação a avaliação ecocardiográfica morfométrica, notamos conforme esperado em animais infartados, redução da espessura do septo interventricular no grupo DM+IAM em relação ao grupo controle, sendo esta redução evitada pelo tratamento em ambas as doses. Ainda, se observou um aumento do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo nos animais dos grupos DM+IAM e DM+IAM+EMPA3 em relação ao grupo controle, porém, o tratamento com a dose de 10 mg/kg foi capaz de prevenir o aumento do DIVEd. Corroborando com os achados representativos de disfunção sistólica, notamos um aumento do diâmetro interno do VE na sístole nos animais dos grupos DM+IAM e DM+IAM+EMPA3 em relação ao grupo CTL, demonstrando menor habilidade de promover redução de seu volume durante a sístole e conseqüentemente gerando menores volumes sistólico e débito cardíaco, entretanto, o tratamento com empagliflozina na dose de 10 mg/kg, foi capaz de evitar o aumento do DIVEs, sendo menor neste grupo em relação ao grupos DM+IAM e DM+IAM+EMPA3.

Os achados apresentados, nos permitem concluir que em relação as funções sistólica e diastólica avaliadas ecocardiograficamente, globalmente: houve piora destas nos animais diabéticos e infartados, porém estas disfunções foram atenuadas pelo tratamento com empagliflozina nas doses de 3 mg/kg e 10 mg/kg, sendo mais significativa no tratamento com a dose mais elevada.

Foram avaliadas histologicamente as áreas totais dos ventrículo esquerdo e direito, assim como a área total de colágeno nestas regiões. Como já descrito, animais diabéticos e infartados apresentam maior deposição de colágeno no tecido cardíaco, colaborando no surgimento de alteração da complacência ventricular e finalmente insuficiência cardíaca(10,11,40,81,95), sendo a utilização dos inibidores de SGLT2, capazes de atenuar tal alteração(29,96–98). Neste estudo, foi avaliada a região total de colágeno, sem, contudo, diferenciar os tipos de colágeno envolvidos neste processo. Pudemos observar que as áreas de tecido tanto do ventrículo esquerdo como do direito, não se modificam nos animais diabéticos e infartados em relação ao controle e ainda, não foi

modificada pelos tratamentos. Ainda, se pode notar aumento da área de colágeno no ventrículo esquerdo nos animais dos grupos DM+IAM e DM+IAM+EMPA3 em relação ao grupo controle, sendo esta elevação atenuada pelo tratamento com a dose de 10 mg/kg de empagliflozina.

Foram avaliadas no presente estudo as proteínas relacionadas ao manejo do cálcio intracelular: Fosfolambam total, fosfolambam fosforilado e SERCA2. Observamos uma redução da relação fosfolambam fosforilada/fosfolambam total nos animais diabéticos e infartados sem e com tratamento. A SERCA2 se apresentou reduzida no grupo tratado em relação ao grupo apenas diabético e infartado sem tratamento. Ainda, a relação SERCA2/fosfolambam total foi menor no grupo tratado em relação ao grupo controle. Novamente, pudemos neste estudo avaliar a expressão destas proteínas, sem contudo, avaliar a expressão de outras proteínas relacionadas ao manejo do cálcio, além disso, o estudo do transiente de cálcio poderia demonstrar com muito mais clareza tais alterações.

Outras proteínas de matriz extracelular, como a ERK 1 e 2 são relacionados ao estímulo para o desenvolvimento de hipertrofia e também estão de certa forma relacionadas ao estímulo na deposição de colágeno no tecido cardíaco. Pudemos observar uma elevação na expressão das ERK1/2 totais no tecido cardíaco nos animais diabéticos e infartados em relação ao grupo controle, sendo esta elevação atenuada pelo tratamento e ainda, uma elevação das ERK 1/2 fosforilada e da relação ERK1/2 fosforilada/ERK 1/2 total nos grupos diabéticos e infartados, não sendo tal alteração atenuada pelo tratamento. Contudo, apesar destas elevações, não foram observadas ecocardiograficamente e histologicamente alterações que pudessem ser justificadas pelo aumento da expressão de tais proteínas.

O estresse oxidativo está intimamente relacionado a alterações morfofuncionais do tecido cardíaco em animais diabéticos(15,24,70,99). Para tal elucidação, neste trabalho foram avaliadas a expressão de substâncias pró oxidantes e antioxidantes no ventrículo esquerdo. Com isso, não observamos aumento da expressão dos pró oxidantes (carbonilas, peróxido e NADPH oxidase) nos animais que sofreram qualquer tipo de intervenção (DM, IAM ou tratamento). Em relação aos antioxidantes, notamos uma aumento na expressão

do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) e na enzima superóxido dismutase (SOD) no grupo tratado em relação aos grupos diabético infartado e ao grupo controle. Ainda, notamos uma aumento da enzima catalase (CAT) e do nitrito no grupo tratado em relação ao grupo DM+IAM. Tais achados, sugerem que a defesa antioxidante no tecido cardíaco dos animais diabéticos esteja comprometida, sendo o tratamento capaz de proteger o tecido cardíaco do surgimento de tal redução.

## 8 Conclusão

No presente estudo avaliamos de diversas formas os efeitos protetores do miocárdio em diferentes situações fisiopatológicas (diabetes mellitus, infarto e na associação de ambas).

Dessa forma, confirmamos a nossa hipótese de que a empagliflozina tem um papel protetor do miocárdio, tanto em animais diabéticos como em normoglicêmicos.

Esta proteção se deveu a atenuação dos efeitos deletérios associados a isquemia miocárdica e ao diabetes na estrutura e na função do coração.

Os mecanismos relacionados a esta proteção envolveram: a modulação do estresse oxidativo, das proteínas relacionadas ao manejo do cálcio intracelular, das proteínas de matriz extracelular, da deposição de colágeno e do sistema nervoso autônomo através do barorreflexo.

Em conclusão, os animais diabéticos tratados com empagliflozina em ambas as doses, apresentaram melhores índices hemodinâmicos da pressão arterial, índices autonômicos. Quanto a repercussão do tratamento na estrutura cardíaca e função cardíaca, se observou melhora das funções sistólica e diastólica nos grupos tratados em ambas as doses.

Nos grupos infartados, o tratamento com empagliflozina em ambas as doses foi capaz de atenuar os efeitos hemodinâmicos e autonômicos, assim como do prejuízo da função e da estrutura cardíaca associados a isquemia miocárdica. Essa melhora se deve ao estresse oxidativo (aumento das defesas antioxidantes) e da modulação da expressão das proteínas relacionadas ao manejo do cálcio intracelular, na qual o aumento da expressão da SERCA2 em áreas preservadas do miocárdio contribuem na melhora da função global do coração.

De forma semelhante, no coração diabético e infartado, notamos melhora da função e estrutura cardíaca nos animais tratados. Novamente pelo estresse oxidativo, da deposição de colágeno e na modulação da expressão da SERCA2.

Dessa forma, esse estudo demonstrou os efeitos benéficos do uso da empagliflozina na isquemia miocárdica e no diabetes, através de mecanismos que vão além da clássica modulação do volume secundária a diurese osmótica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hachinski V, Donnan GA, Gorelick PB, Hacke W. NIH Public Access Stroke : Working toward a Prioritized World Agenda. 2013;5(4):238–56.
2. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs), 2021. 2021.
3. BRASIL. Sistema de Informações Sobre Mortalidade. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (datasus) (Org.). Óbitos por residência por ano do óbito [Internet]. 2015. Available from: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=060701>
4. Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2008 Dec 1;29(23):2909–45.
5. Savarese V, Ahmed I, Goldstein BJ. Coronary artery disease screening in patients with diabetes. *Endocrine*. 2008;33(3):225–9.
6. C.S. F, L. S, R.B. DSr, P.W.F. W. The Significant Effect of Diabetes Duration on Coronary Heart Disease Mortality: The Framingham Heart Study. *Diabetes Care*. 2004;27(3):704–8.
7. Whellan DJ, Hasselblad V, Peterson E, O'Connor CM, Schulman KA. Metaanalysis and review of heart failure disease management randomized controlled clinical trials. *Am Heart J*. 2005 Apr 1;149(4):722–9.
8. Saparov A, Chen CW, Beckman SA, Wang Y, Huard J. The role of antioxidation and immunomodulation in postnatal multipotent stem cell-mediated cardiac repair. *Int J Mol Sci*. 2013 Aug 6;14(8):16258–79.
9. Stenzel W, Alber G. Regulation of the Inflammatory Response in Brain. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. 2007;110(1):235–62.
10. Nah DY, Rhee MY. The inflammatory response and cardiac repair after myocardial infarction. *Korean Circ J*. 2009;39(10):393–8.
11. Mann DL, Liu P, Irwin MW, Mak S, Qu R, Penninger JM, et al. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor- $\alpha$  in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation*. 1999;99(11):1492–8.
12. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(3):569–82.
13. Urheim S, Rabben SI, Skulstad H, Lyseggen E, Ihlen H, Smiseth OA. Regional myocardial work by strain Doppler echocardiography and LV pressure: a new method for quantifying myocardial function. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005 May;288(5):H2375–80.
14. Rocha JA, Ribeiro SP, França CM, Coelho O, Alves G, Lacchini S, et al. Increase in cholinergic modulation with pyridostigmine induces anti-inflammatory cell recruitment soon after acute myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016 Apr 15;310(8):R697-706.

15. Bezerra OC, França CM, Rocha JA, Neves GA, Souza PRM, Teixeira Gomes M, et al. Cholinergic Stimulation Improves Oxidative Stress and Inflammation in Experimental Myocardial Infarction. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–12.
16. Feriani DJ, Souza GIH, Carrozzi NM, Mostarda C, Dourado PMM, Consolim-Colombo FM, et al. Impact of exercise training associated to pyridostigmine treatment on autonomic function and inflammatory profile after myocardial infarction in rats. *Int J Cardiol*. 2017;
17. Roden M. Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation und Diagnose. *Wien Klin Wochenschr*. 2016 Apr 6;128(S2):37–40.
18. Mychaleckyj JC, Todd JA, Bonella P, Fear AL. 0038-0717(86)90076-3;Searchterms=;Pg=Article;Dcopt=Ist;;Tile=1;Pos=Right;Sz=180X150,250X300,250X250,. 2014;57(4):1084–92.
19. De Angelis K, Schaan BD, Rodrigues B, Malfitano C, Irigoyen MC. Disfunção autonômica cardiovascular no diabetes mellitus experimental. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2007;
20. Machi JF, Bernardes N, Mostarda C, Moraes-Silva IC, Irigoyen MC, De Angelis K, et al. Walking promotes metabolic and baroreflex sensitivity improvement in fructose-fed male rats. *Eur J Appl Physiol* [Internet]. 2013 Jan 8 [cited 2019 Jul 22];113(1):41–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00421-012-2411-z>
21. Wichi R, Malfitano C, Rosa K, De Souza SB, Salemi V, Mostarda C, et al. Noninvasive and invasive evaluation of cardiac dysfunction in experimental diabetes in rodents. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2007 Apr 26 [cited 2019 Jul 22];6:14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17462095>
22. Rodrigues B, Jorge L, Mostarda CT, Rosa KT, Medeiros A, Malfitano C, et al. Aerobic exercise training delays cardiac dysfunction and improves autonomic control of circulation in diabetic rats undergoing myocardial infarction. *J Card Fail* [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2019 Jul 22];18(9):734–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22939043>
23. Malfitano C, Alba Loureiro TC, Rodrigues B, Sirvente R, Salemi VMC, Rabechi NB, et al. Hyperglycaemia protects the heart after myocardial infarction: Aspects of programmed cell survival and cell death. *Eur J Heart Fail*. 2010;12(7):659–67.
24. Malfitano C, Barboza CA, Mostarda C, da Palma RK, dos Santos CP, Rodrigues B, et al. Diabetic hyperglycemia attenuates sympathetic dysfunction and oxidative stress after myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13(1):1–9.
25. Sarashina A, Koiwai K, Seman LJ, Yamamura N, Taniguchi A, Negishi T, et al. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Single Doses of Empagliflozin, a Sodium Glucose Cotransporter 2 (SGLT2) Inhibitor, in Healthy Japanese Subjects. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2013;28(3):213–9.
26. Wright EM, Hirayama BA, Loo DF. Active sugar transport in health and disease. In: *Journal of Internal Medicine*. 2007. p. 32–43.
27. Kanai Y, Lee WS, You G, Brown D, Hediger MA. The Human Kidney Low Affinity Na<sup>+</sup>/glucose Cotransporter SGLT2 Delineation of the Major Renal Reabsorptive Mechanism for D-Glucose.

28. DeFronzo RA, Davidson JA, del Prato S. The role of the kidneys in glucose homeostasis: A new path towards normalizing glycaemia. Vol. 14, *Diabetes, Obesity and Metabolism*. Blackwell Publishing Ltd; 2012. p. 5–14.
29. List JF, Whaley JM. Glucose dynamics and mechanistic implications of SGLT2 inhibitors in animals and humans. Vol. 79, *Kidney International*. 2011.
30. Kosiborod M, Cavender MA, Fu AZ, Wilding JP, Khunti K, Holl RW, et al. Lower risk of heart failure and death in patients initiated on sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors versus other glucose-lowering drugs: The CVD-REAL study (Comparative Effectiveness of Cardiovascular Outcomes in New Users of Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors). *Circulation*. 2017 Jul 18;136(3):249–59.
31. Carbone S, Dixon DL. The CANVAS Program: implications of canagliflozin on reducing cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2019 May 28 [cited 2019 Jun 15];18(1):64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31138195>
32. Sattar N, McLaren J, Kristensen SL, Preiss D, McMurray JJ. SGLT2 Inhibition and cardiovascular events: why did EMPA-REG Outcomes surprise and what were the likely mechanisms? *Diabetologia* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 22];59(7):1333–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27112340>
33. Steiner S. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. Vol. 13, *Zeitschrift fur Gefassmedizin*. Krause und Pachernegg GmbH; 2016. p. 17–8.
34. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2015 Nov 26 [cited 2019 Jul 22];373(22):2117–28. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1504720>
35. Standl E, Schnell O, McGuire DK. Heart Failure Considerations of Antihyperglycemic Medications for Type 2 Diabetes. *Circ Res*. 2016 May 27;118(11):1830–43.
36. Guthrie R. Empagliflozin reduces cardiovascular events and mortality in type 2 diabetes. *Postgrad Med*. 2016;
37. Savarese G, Sattar N, Januzzi J, Verma S, Lund LH, Fitchett D, et al. Empagliflozin Is Associated With a Lower Risk of Post-Acute Heart Failure Rehospitalization and Mortality. *Circulation*. 2019;139(11):1458–60.
38. Bonora E, Cigolini M. DPP-4 inhibitors and cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus. Expectations, observations and perspectives. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2016.
39. Crea F. Focus on heart failure and cardiomyopathies: new ESC Guidelines and key meta-analyses. *Eur Heart J* [Internet]. 2023 Oct 1;44(37):3487–91. Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/article/44/37/3487/7287528>
40. Size I. Myocardial Infarct Size and Ventricular Function in Rats. 1977;631–8.
41. Shimamoto K, Ura N. Mechanisms of insulin resistance in hypertensive rats. In: *Clinical and Experimental Hypertension*. 2006. p. 543–52.

42. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265–75.
43. 1-s2.0-S0076687994330417-main.
44. Tietze F. Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues. Vol. 27, *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY.* 1969.
45. Pick E, Keisari Y. A SIMPLE COLORIMETRIC METHOD FOR THE MEASUREMENT OF HYDROGEN PEROXIDE PRODUCED BY CELLS IN CULTURE '. Vol. 38, *Journal of Immunological Methods.* 1980.
46. Boveris A, Chance B. The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide GENERAL PROPERTIES AND EFFECT OF HYPERBARIC OXYGEN. Vol. 134, *Biochem. J.* 1973.
47. MARKLUND S, MARKLUND G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur J Biochem.* 1974;47(3):469–74.
48. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. Vol. 239, *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY.* 1996.
49. 1-s2.0-S007668799901068X-main.
50. Bolzán AD, Bianchi MS. Genotoxicity of Streptozotocin. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 2002 Dec;512(2–3):121–34.
51. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *Journal of Clinical Investigation.* 1969 Nov 1;48(11):2129–39.
52. Dall’Ago P, Fernandes TG, Machado UF, Belló AA, Irigoyen MC. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 1997 Jan;30(1):119–24.
53. Maeda CY, Fernandes TG, Lulhier F, Irigoyen MC. Streptozotocin diabetes modifies arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. *Braz J Med Biol Res.* 1995 Apr;28(4):497–501.
54. Fathi A, Vickneson K, Singh JS. SGLT2-inhibitors; more than just glycosuria and diuresis. Vol. 26, *Heart Failure Reviews.* Springer; 2021. p. 623–42.
55. Malfitano C, de Souza Junior AL, Carbonaro M, Bolsoni-Lopes A, Figueroa D, de Souza LE, et al. Glucose and fatty acid metabolism in infarcted heart from streptozotocin-induced diabetic rats after 2 weeks of tissue remodeling. *Cardiovasc Diabetol.* 2015;14(1):1–10.
56. Yu Z, McNeill JH. Blood pressure and heart rate response to vasoactive agents in conscious diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1992 Dec 1;70(12):1542–8.
57. De Angelis KLD, Oliveira AR, Dall’Ago P, Peixoto LRA, Gadonski G, Lacchini S, et al. Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2000 Jun;33(6):635–41.
58. Brands MW, Fitzgerald SM, Hewitt WH, Hailman AE. Decreased cardiac output at the onset of diabetes: renal mechanisms and peripheral vasoconstriction. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* 2000 May 1;278(5):E917–24.

59. Cohen AJ, McCarthy DM, Rossetti RR. Renin Secretion by the Spontaneously Diabetic Rat. *Diabetes*. 1986 Mar 1;35(3):341–6.
60. Jackson C V., Carrier GO. Influence of Short-Term Experimental Diabetes on Blood Pressure and Heart Rate in Response to Norepinephrine and Angiotensin II in the Conscious Rat. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1983 Mar;5(2):260–5.
61. Lam-Chung CE. Comprehensive review of SGLT2 inhibitors' efficacy through their diuretic mode of action in diabetic patients. Vol. 14, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media SA; 2023.
62. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Eur Heart J*. 1996 Mar;17(3):354–81.
63. Ewing DJ, Campbell IW, Clarke BF. The natural history of diabetic autonomic neuropathy. *Q J Med*. 1980;49(193):95–108.
64. Rovere MT La, Bigger JT, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. *The Lancet*. 1998 Feb;351(9101):478–84.
65. Irigoyen MC, De Angelis K, dos Santos F, Dartora DR, Rodrigues B, Consolim-Colombo FM. Hypertension, Blood Pressure Variability, and Target Organ Lesion. *Curr Hypertens Rep*. 2016;18(4).
66. La Rovere MT, Pinna GD, Hohnloser SH, Marcus FI, Mortara A, Nohara R, et al. Baroreflex Sensitivity and Heart Rate Variability in the Identification of Patients at Risk for Life-Threatening Arrhythmias. *Circulation*. 2001 Apr 24;103(16):2072–7.
67. Fazan R, da Silva VJD, Ballejo G, Salgado HC. Power spectra of arterial pressure and heart rate in streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Hypertens*. 1999 Apr;17(4):489–95.
68. GUZZETTI S, COGLIATI C, TURIEL M, CREMA C, LOMBARDI F, MALLIANI A. Sympathetic predominance followed by functional denervation in the progression of chronic heart failure. *Eur Heart J*. 1995 Aug;16(8):1100–7.
69. Dall'Ago P, D'Agord Schaan B, da Silva VOK, Werner J, da Silva Soares PP, de Angelis K, et al. Parasympathetic dysfunction is associated with baroreflex and chemoreflex impairment in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Autonomic Neuroscience*. 2007 Jan;131(1–2):28–35.
70. Li C, Zhang J, Xue M, Li X, Han F, Liu X, et al. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart. *Cardiovasc Diabetol*. 2019 Feb 2;18(1).
71. Daud E, Ertracht O, Bandel N, Moady G, Shehadeh M, Reuveni T, et al. The impact of empagliflozin on cardiac physiology and fibrosis early after myocardial infarction in non-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2021 Dec 1;20(1).
72. Vilahur G, Casani L, Peña E, Juan-Babot O, Mendieta G, Crespo J, et al. HMG-CoA reductase inhibition prior reperfusion improves reparative fibrosis post-myocardial infarction in a preclinical experimental model. *Int J Cardiol [Internet]*. 2014;175(3):528–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.06.040>

73. Mostarda C, Rodrigues B, Medeiros A, Moreira ED, Moraes-Silva IC, Brum PC, et al. Baroreflex deficiency induces additional impairment of vagal tone, diastolic function and calcium handling proteins after myocardial infarction. *Am J Transl Res*. 2014;6(3):320–8.
74. Chen MYC, Tsai BCK, Kuo WW, Kuo CH, Lin YM, Hsieh DJY, et al. Diosgenin Attenuates Myocardial Cell Apoptosis Triggered by Oxidative Stress through Estrogen Receptor to Activate the PI3K/Akt and ERK Axes. *Am J Chin Med (Gard City N Y)*. 2023 Jan 17;51(05):1211–32.
75. Zhu J, Li Q, Sun Y, Zhang S, Pan R, Xie Y, et al. Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Deficiency Alleviates Angiotensin II-Induced Cardiac Fibrosis Through the Protein Kinase B/Extracellular Signal-Regulated Kinase/Nuclear Factor- $\kappa$ B Pathway. *J Am Heart Assoc*. 2023 Sep 19;12(18).
76. Mehmet Ekici, Güngör H, Karayığıt MÖ, Turgut NH, Koçkaya M, Karataş Ö, et al. Cardioprotective Effect of Empagliflozin in Rats with Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction: Evaluation of Lipid Profile, Oxidative Stress, Inflammation, DNA Damage, and Apoptosis. *Biology Bulletin*. 2022 Feb 1;49:S159–72.
77. Pruett JE, Everman SJ, Hoang NH, Salau F, Taylor LC, Edwards KS, et al. Mitochondrial function and oxidative stress in white adipose tissue in a rat model of PCOS: effect of SGLT2 inhibition. *Biol Sex Differ*. 2022 Dec 1;13(1).
78. Ashrafi Jigheh Z, Ghorbani Haghjo A, Argani H, Roshangar L, Rashtchizadeh N, Sanajou D, et al. Empagliflozin alleviates renal inflammation and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats partly by repressing HMGB1-TLR4 receptor axis. *Iran J Basic Med Sci [Internet]*. 2019 Apr [cited 2019 Jun 15];22(4):384–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31168342>
79. Mancia G, Grassi G. [Physiopathologic and clinical features of hypertensive cardiopathy]. *Cardiologia*. 1994 Dec;39(12 Suppl 1):291–4.
80. Mill JG, Vassallo D V, Leite CM. Time course of changes in heart rate and sympathetic tone after coronary artery ligation in rats. *Braz J Med Biol Res*. 1991;24(8):855–8.
81. De Angelis K, Leirner AA, Irigoyen MC, Cestari IA. Nonstimulated cardiomyoplasty improves hemodynamics in myocardial-infarcted rats. *Artif Organs*. 2001 Nov;25(11):939–43.
82. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, de Zeeuw D, Fulcher G, Erond N, et al. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2017 Aug 17;377(7):644–57.
83. Wiviott SD, Raz I, Bonaca MP, Mosenzon O, Kato ET, Cahn A, et al. Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2019 Jan 24;380(4):347–57.
84. McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE, Køber L, Kosiborod MN, Martinez FA, et al. Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *New England Journal of Medicine*. 2019 Nov 21;381(21):1995–2008.
85. Connelly KA, Zhang Y, Desjardins JF, Nghiem L, Visram A, Batchu SN, et al. Load-independent effects of empagliflozin contribute to improved cardiac function in experimental heart failure with reduced ejection fraction. *Cardiovasc Diabetol*. 2020 Feb 8;19(1):13.
86. Wan N, Rahman A, Hitomi H, Nishiyama A. The Effects of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors on Sympathetic Nervous Activity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Jul 26;9.

87. Zhong J, Ouyang H, Sun M, Lu J, Zhong Y, Tan Y, et al. Tanshinone IIA attenuates cardiac microvascular ischemia-reperfusion injury via regulating the SIRT1-PGC1 $\alpha$ -mitochondrial apoptosis pathway. *Cell Stress Chaperones*. 2019 Sep 6;24(5):991–1003.
88. Li C, Ma Q, Toan S, Wang J, Zhou H, Liang J. SERCA overexpression reduces reperfusion-mediated cardiac microvascular damage through inhibition of the calcium/MCU/mPTP/necroptosis signaling pathways. *Redox Biol*. 2020 Sep;36:101659.
89. Schwartz P. ATRAMI: a mark in the quest for the prognostic value of autonomic markers. *Eur Heart J*. 1998 Nov;19(11):1593–5.
90. Pernaje Seetharam S, Shankar MS V, Udupa K, A. R, Reddy N. Prognostic value of heart rate variability in acute coronary syndrome. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2023 May 8;34(3):337–47.
91. De Maria B, Parati M, Dalla Vecchia LA, La Rovere MT. Day and night heart rate variability using 24-h ECG recordings: a systematic review with meta-analysis using a gender lens. *Clinical Autonomic Research*. 2023 Aug 4;
92. Barboza C, Souza G, Oliveira J, Silva L, Mostarda C, Dourado P, et al. Cardioprotective Properties of Aerobic and Resistance Training Against Myocardial Infarction. *Int J Sports Med*. 2016 Feb 29;37(06):421–30.
93. Schaun MI, Motta LL, Teixeira R, Klamt F, Rossato J, Lehnen AM, et al. Preventive Physical Training Partially Preserves Heart Function and Improves Cardiac Antioxidant Responses in Rats After Myocardial Infarction Preventive Physical Training and Myocardial Infarction in Rats. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2017 Jun;27(3):197–203.
94. Sohma R, Inoue T, Abe S, Taguchi I, Kikuchi M, Toyoda S, et al. Cardioprotective effects of low-dose combination therapy with a statin and an angiotensin receptor blocker in a rat myocardial infarction model. *J Cardiol [Internet]*. 2012;59(1):91–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jjcc.2011.07.013>
95. Luo K qin, Long H bao, Xu B can. Reduced Apoptosis After Acute Myocardial Infarction by Simvastatin. *Cell Biochem Biophys*. 2014;71(2):735–40.
96. Delgado E, Jódar E, Mezquita-Raya P, Moreno-Pérez Ó. Benefits of SGLT2i for the Treatment of Heart Failure Irrespective of Diabetes Diagnosis: A State-of-the-Art Review. Vol. 13, *Diabetes Therapy*. Adis; 2022. p. 19–34.
97. Ul Amin N, Sabir F, Amin T, Sarfraz Z, Sarfraz A, Robles-Velasco K, et al. SGLT2 Inhibitors in Acute Heart Failure: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Healthcare (Switzerland)*. 2022 Dec 1;10(12).
98. Michel MC, Mayoux E, Vallon V. A comprehensive review of the pharmacodynamics of the SGLT2 inhibitor empagliflozin in animals and humans. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2015 Aug 22;388(8):801–16.
99. Kimura Y, Kuno A, Tanno M, Sato T, Ohno K, Shibata S, et al. Canagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, normalizes renal susceptibility to type 1 cardiorenal syndrome through reduction of renal oxidative stress in diabetic rats. *J Diabetes Investig*. 2019;1–14.