



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Felipe César Damatto

**Influência da Empagliflozina sobre à Remodelação Cardíaca
Induzida por Infarto do Miocárdio em Ratos**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus
de Botucatu, para obtenção do título
de Mestre em Fisiopatologia em
Clínica Médica – Ciências da
Saúde.

Orientador: Prof. Titular Katashi Okoshi
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Camila Moreno Rosa Bassetto

**Botucatu
2021**

Felipe César Damatto

Influência da Empagliflozina sobre à Remodelação Cardíaca
Induzida por Infarto do Miocárdio em Ratos

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus
de Botucatu, para obtenção do título
de Mestre em Fisiopatologia em
Clínica Médica – Ciências da
Saúde.

Orientador: Prof. Titular Katashi Okoshi
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Camila Moreno Rosa Bassetto

Botucatu
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Damatto, Felipe César.

Influência da empagliflozina sobre a remodelação cardíaca induzida por infarto do miocárdio em ratos / Felipe César Damatto. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Katashi Okoshi

Coorientador: Camila Moreno Rosa Bassetto

Capes: 40000001

1. Estresse oxidativo. 2. Infarto. 3. Metabolismo energético. 4. Remodelação cardíaca. 5. Inibidores do transportador 2 de sódio-glicose.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Infarto; Metabolismo energético; Remodelação cardíaca; SGLT2.

Epígrafe

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

Leonardo da Vinci

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha família e amigos, que mesmo muitas vezes longe, sempre me motivam ao melhor.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus simplesmente por tudo.

À minha mãe Jacira, ao meu pai Erval Rafael, aos meus irmãos Erval Júnior e Ricardo, à minha cunhada Priscila e as minhas sobrinhas Isabela e Melissa por estarem presentes em minha vida sempre apoiando, educando e proporcionando momentos esplêndidos.

Ao professor Dr. Katashi pelos ensinamentos, sabedoria, dedicação, paciência, e por me orientar nessa jornada tão difícil, mas muito valorosa.

À Dr^a. Camila por ter aceitado a parceria e ter sido coorientadora do presente estudo sempre se dispondo a auxiliar no que fosse necessário.

À professora Dr^a. Marina pelos ensinamentos e ter acreditado no meu potencial, oportunizar a minha entrada no grupo de pesquisa e iniciação no processo científico que resultou no presente trabalho e em muitos outros.

Aos amigos e colegas Luana, Mariana Janini, Aline, Marcelo, David, Paula, Thierres, Leiliane, Patrícia, Mariana Gatto, Ingrid, Lidiane, Éder, Adriana, Maria, Guilherme, Gustavo, Dijon e Zé Georgete pelos ensinamentos, auxílios, colaborações, conselhos, conversas, risadas e por tornarem esse período mais incrível e prazeroso.

Agradecer novamente ao Dr. Marcelo e Dr^a. Luana por contribuírem com suas correções, avaliações, sugestões, tempo e conhecimento na qualificação e defesa do presente estudo.

Ao Professor Dr. Leonardo e professora Dr^a. Ana Angélica por terem colaborado de forma inigualável e agregando valor científico e pela dedicação empenhada.

Sou muito grato às instituições de ensino superior UNESP de Botucatu, UNESP de Bauru, FATEC de Botucatu e aos professores, funcionários, alunos e ex-alunos por contribuírem com meu processo de escolarização, proporcionando diversos tipos de sentimento no decorrer de minha formação que ao final posso afirmar que foi um período de minha vida incrível.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (processo nº 2018/00567-4).

Muito obrigado!

Sumário

Resumo	1
Abstract.....	4
Introdução	7
Objetivo	12
Material e Métodos	14
Resultados.....	22
Discussão	38
Conclusão	44
Referências	46

Lista de Tabelas

Tabela 1. Consumo diário médio de ração (g) durante o período de tratamento.....	24
Tabela 2. Consumo diário médio de água (mL) durante o período de tratamento	24
Tabela 3. Glicemia (mg/dL) durante o período de tratamento	25
Tabela 4. Progressão de peso corporal (g) dos ratos durante o período experimental	25
Tabela 5. Avaliação ecocardiográfica final dos parâmetros estruturais do coração.....	28
Tabela 6. Avaliação ecocardiográfica final da função sistólica do ventrículo esquerdo....	28
Tabela 7. Avaliação ecocardiográfica final da função diastólica do ventrículo esquerdo..	29
Tabela 8. Avaliação das funções sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo pela Doppler-ecocardiografia tissular.....	29
Tabela 9. Parâmetros corporais e cardíacos dos animais.....	30
Tabela 10. Frequência de sinais clínicos e patológicos de insuficiência cardíaca em ratos com infarto do miocárdio	30
Tabela 11. Análises histológicas dos diâmetros dos miócitos e fração de colágeno do ventrículo esquerdo.....	33
Tabela 12. Estresse oxidativo do miocárdio do ventrículo esquerdo	36
Tabela 13. Metabolismo energético do miocárdio do ventrículo esquerdo.....	37
Tabela 14. Complexo respiratório do miocárdio do ventrículo esquerdo	37

Lista de Figuras

Figura 1. Porcentagem de ratos que sobreviveram no decorrer do tratamento	23
Figura 2. Progressão de peso corporal (g) dos ratos durante o período experimental	26
Figura 3. Porcentagem da área de infarto medida em corte histológico do ventrículo esquerdo.....	31
Figura 4. Cortes histológicos do ventrículo esquerdo para análise da área de infarto	32
Figura 5. Cortes histológicos do ventrículo esquerdo corados com hematoxilina-eosina .	34
Figura 6. Cortes histológicos do ventrículo esquerdo corados com <i>picrosirius red</i>	35

Lista de Abreviaturas

AE: átrio esquerdo

ANOVA: análise de variância

AO: diâmetro da aorta

A': pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral (Doppler tissular)

A' lateral: onda A' do anel mitral lateral (Doppler tissular)

A' septal: onda A' do anel mitral septal (Doppler tissular)

BHADH: β -hidroxiacil-CoA desidrogenase

CAT: catalase

CS: citrato sintase

DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

DM: diabetes mellitus

DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo

EDPP: espessura diastólica da parede posterior

EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular

ERVE: espessura relativa do ventrículo esquerdo

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

E/A: razão entre os picos de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral

E': pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral (Doppler tissular)

E' lateral: onda E' do anel mitral lateral (Doppler tissular)

E' septal: onda E' do anel mitral septal (Doppler tissular)

FC: frequência cardíaca

EMP: empagliflozina

FE: fração de ejeção

GPX: glutathione peroxidase

Hidrop.lip: hidroperóxido de lipídeo

IC: insuficiência cardíaca

i.p.: intraperitoneal

IM: infarto do miocárdio

IM+EMP: infarto do miocárdio tratado com empagliflozina

IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo

LDH: lactato desidrogenase

MVE: massa do ventrículo esquerdo

Onda A: pico de velocidade do fluxo de enchimento tardio transmitral

Onda E: pico de velocidade de fluxo de enchimento inicial transmitral

Onda S: velocidade máxima de deslocamento sistólico do anel mitral (Doppler tissular)

Onda S lateral: onda S do anel mitral lateral (Doppler tissular)

Onda S lateral: onda S do anel mitral lateral (Doppler tissular)

PC: peso corporal

PFK: fosfofrutoquinase

SGLT2: cotransportador de sódio-glicose tipo 2

SHAM: grupo sham sem infarto e sem tratamento

SHAM+EMP: grupo sham sem infarto e tratado com empagliflozina

SOD: superóxido dismutase

TDE: tempo de desaceleração da onda E

Tei: índice de performance miocárdica

TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico

TRIVn: tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela frequência cardíaca

VD: ventrículo direito

VE: ventrículo esquerdo

VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior

% enc.endo: porcentagem de encurtamento endocárdico

Resumo

Introdução: O infarto do miocárdio (IM) está entre as principais causas de mortalidade no mundo e, quando não evolui a óbito, pode resultar em remodelação cardíaca e insuficiência cardíaca. Estudos recentes com inibidores seletivos da proteína co-transportadora de sódio-glicose tipo 2 (SGLT2), usados no tratamento de diabetes, sugerem possível melhora de agravo cardiovascular devido à atenuação da remodelação cardíaca. Os efeitos benéficos podem ser devido às alterações no metabolismo energético, glicemia, adiposidade visceral, concentração sérica de insulina, pressão sanguínea, estresse oxidativo, função endotelial, progressão de doença renal, e a possibilidade de modular benéficamente proteínas co-transportadoras de cálcio no coração. O presente estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos do inibidor da SGLT2 empagliflozina (EMP) sobre o coração de ratos submetido à remodelação cardíaca induzida por IM. **Métodos:** Foram constituídos quatro grupos de ratos Wistar machos: sem infarto (SHAM; n=22); sem infarto e com EMP (SHAM+EMP; n=22); com infarto (IM; n=22); com infarto e com EMP (IM+EMP; n=22). EMP foi adicionada à ração na dose de 5 mg/kg/dia, durante 12 semanas. Dez dias após o infarto e ao final do período experimental foram realizados ecocardiogramas transtorácicos. Foi realizada análise histológica para determinar o tamanho do infarto, fração colágena intersticial e tamanho dos cardiomiócitos. As análises do estresse oxidativo, do metabolismo energético e a atividade do complexo respiratório foram realizadas em miocárdio do ventrículo esquerdo por espectrofotometria. As comparações entre os grupos foram realizadas por ANOVA de duas vias. A comparação entre o tamanho dos infartos foi realizada pelo teste t de Student. Para análise de frequência de sinais clínicos foi usado o teste de Goodman. **Resultados:** Os animais infartados tratados apresentaram maior consumo de ração e água e maior taxa glicêmica que os ratos infartados não tratados. No entanto, o peso corporal não foi diferente entre os grupos ao final do estudo. A efusão pleural foi observada em 50% dos ratos do grupo IM e nenhum caso no grupo IM+EMP ($p<0,01$). A EMP não causou diferença no tamanho dos infartos, na fração colágena intersticial e no diâmetro dos cardiomiócitos. Em relação as variáveis ecocardiográficas, o tratamento com EMP reduziu o diâmetro do átrio esquerdo em animais infartados. As demais variáveis não mostraram diferença estatística com o tratamento. O estresse oxidativo, avaliado pela concentração miocárdica de hidroperóxido de lipídeo foi menor no grupo IM+EMP em relação ao grupo IM. No entanto, as enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase não se alteraram com a EMP. Nos grupos infartados, as enzimas do metabolismo energético lactato desidrogenase e citrato sintase mostraram-se elevados, e a enzima beta hidroxiacil-CoA desidrogenase se

mostrou reduzida. Não houve diferença significativa entre os grupos infartados. O complexo respiratório I, II e ATP sintase não foi diferente entre os grupos infartados. **Conclusão:** No modelo de infarto do miocárdio em ratos não diabéticos, a empagliflozina diminui o diâmetro do átrio esquerdo, melhora o estresse oxidativo e evita a ocorrência de derrame pleural que é um dos sinais de insuficiência cardíaca congestiva.

Palavras-chave: Infarto, remodelação cardíaca, estresse oxidativo, metabolismo energético, SGLT2, empagliflozina.

Abstract

Introduction: Myocardial infarction (MI) is one of the main causes of mortality worldwide and, when it does not progress to death, it may result in cardiac remodeling and heart failure. Recent studies with selective inhibitors of sodium-glucose cotransporter type 2 (SGLT2), a drug indicated for diabetic patients, suggest a possible beneficial effects in cardiovascular injury due to attenuation of cardiac remodeling. Among these effects include improvement of energy metabolism, blood glucose, visceral adiposity, serum insulin concentration, blood pressure, oxidative stress, endothelial function, renal disease progression, and calcium co-transporter modulation in the heart. The aim of this study was to evaluate the effects of the SGLT2 inhibitor empagliflozin (EMP) on the heart of rats undergoing cardiac remodeling induced by MI. **Methods:** Wistar rats were divided into four groups: non-infarcted rats (SHAM; n=22); non-infarcted rats with EMP (SHAM+EMP; n=22); infarcted rats (MI; n=22); infarcted rats with EMP (MI+EMP; n=22). EMP was added to rat chow (5 mg/kg/day) for 12 weeks. Echocardiograms were performed ten days after infarction and at the end of experiment. Histological analysis was performed to measure infarct size, interstitial collagen fraction, and cardiomyocyte diameter. Analyzes of oxidative stress, energy metabolism, and respiratory complex activity were performed in left ventricular myocardium by spectrophotometry. Comparisons between groups were performed by two-way ANOVA. Comparison between infarct sizes was performed using Student's t test. The Goodman test was used for frequency analysis. **Results:** Treated infarcted animals showed higher chow and water intake, and higher blood glucose than untreated infarcted rats. However, body weight was not different between groups at the end of study. Pleural effusion was observed in 50% of MI group rats and none of MI+EMP group ($p<0.01$). EMP caused no difference in infarct size, interstitial collagen fraction, and cardiomyocyte diameter. Echocardiogram showed that EMP reduced the left atrial diameter in infarcted animals. Other echocardiographic variables showed no statistical difference between infarcted groups. Myocardial lipid hydroperoxide concentration was lower in MI+EMP group compared to MI group. However, antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase did not change with EMP. The energy metabolism enzymes lactate dehydrogenase and citrate synthase were higher and beta hydroxyacyl-CoA dehydrogenase enzyme lower in infarcted groups compared to non-infarcted. However, there was no significant difference between the infarcted groups. Respiratory complex I, II, and ATP synthase were not different between the infarcted groups. **Conclusion:** In myocardial infarction model in non-diabetic rats, empagliflozin reduces the left atrial diameter, improves

oxidative stress, and prevents pleural effusion, which is one of the signs of congestive heart failure.

Key-words: Infarction, cardiac remodeling, oxidative stress, energy metabolism, SGLT2, empagliflozin.

Introdução

1. Introdução

As doenças cardiovasculares constituem as principais causas de morte no mundo (Salim et al., 2020). No ano de 2019, nove milhões foram causadas por doença cardíaca isquêmica (World Health Organization, 2020). No Brasil, o infarto do miocárdio alcançou a taxa de mortalidade de 80 pessoas a cada 100 mil habitantes (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2017), sendo responsável pela principal causa de morte no país.

O infarto do miocárdio é causado por isquemia prolongada que provoca, agudamente, morte de miócitos (Thygesen et al., 2018). Após o evento agudo, ocorrem alterações na arquitetura ventricular que acometem tanto a região infartada como regiões ventriculares que não estiveram submetidas à isquemia. As alterações que se desenvolvem tardiamente são conhecidas como remodelação cardíaca, definida por Cohn et al. (2000) como sendo as alterações gênicas, moleculares, celulares e intersticiais que se manifestam clinicamente como modificações no tamanho, forma e função do coração após injúria cardíaca. Múltiplos fatores contribuem para o desenvolvimento e progressão do processo de remodelação cardíaca e disfunção ventricular, tais como alterações no metabolismo energético, proteínas contráteis, trânsito intracelular de cálcio, colágeno intersticial, estresse oxidativo, ativação inflamatória e neuro-hormonal, e morte celular (Azevedo et al., 2016; Aimo et al., 2020).

Alterações no metabolismo energético e aumento do estresse oxidativo ocupam papel de destaque na fisiopatologia da remodelação pós-infarto do miocárdio. Essas anormalidades podem resultar em menor eficiência contrátil e, entre outros efeitos, aumento do estresse oxidativo (Azevedo et al., 2016). O estresse oxidativo decorre do aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição nas defesas antioxidantes, levando a danos em ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, injúria da membrana celular e morte do cardiomiócito (Altenhofer et al., 2015; Aimo et al., 2020).

Apesar de grandes avanços na prevenção e no tratamento da remodelação cardíaca, a morbidade e mortalidade após o infarto do miocárdio ainda são elevadas. Portanto, há grande interesse na descoberta de novos fármacos que possam atuar na prevenção e tratamento da remodelação cardíaca pós-infarto (Lytvyn et al., 2017).

Os inibidores seletivos da proteína cotransportadora de sódio-glicose tipo 2 (SGLT2) foram desenvolvidos para o tratamento do diabetes mellitus (Kaplan et al., 2018). A classe dos inibidores da SGLT2 inclui a empagliflozina, canagliflozina, ipragliflozina,

tofogliflozina e dapagliflozina (Fioretto et al., 2015; Saisho et al., 2020). A SGLT2 está situada no túbulo renal proximal, onde atua na reabsorção de glicose durante o processo de filtração glomerular. Os inibidores da SGLT2 auxiliam no controle do diabetes por meio de redução da reabsorção renal de glicose com consequente glicosúria.

Foi observado no EMPA-REG OUTCOME Study (Zinman et al., 2015) que a adição de empagliflozina à terapia padrão, de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e alto risco para doença cardiovascular, resultou em diminuição da mortalidade geral ou por doença cardiovascular e do risco de hospitalização por insuficiência cardíaca (IC). A melhora dos desfechos foi observada tanto em pacientes com e sem IC à admissão no estudo (Fitchett et al., 2016). Surpreendentemente, os efeitos benéficos começaram a se manifestar a partir de três meses do início do tratamento e se mantiveram por período maior que três anos.

Diferentes efeitos benéficos dos inibidores da SGLT2 foram descritos como redução de hiperglicemia, adiposidade visceral, concentração sérica de insulina, pressão sanguínea, albuminúria e estresse oxidativo; atenuação de disfunção endotelial; e redução da velocidade de progressão de doença renal (Neeland et al., 2016; Bertero et al., 2018; Minze et al., 2018; Cowie et al., 2020; Heerspink et al., 2020). Entretanto, pareceu improvável que modesta melhora nos níveis glicêmicos e lipídicos e no controle da pressão arterial pudesse ter contribuído significativamente para os benefícios cardiovasculares observados a partir de três meses do início do tratamento (Zinman et al., 2015; Mudaliar et al., 2016; Bertero et al., 2018). Estudos prévios haviam sugerido que os inibidores da SGLT2 possuem efeitos renais, independentes de redução da glicemia ou da pressão arterial, como redução de albuminúria e modulação da hemodinâmica renal (Gilbert, 2014; Thomas, 2014; Fitchett et al., 2016). No entanto, somente após os resultados do EMPA-REG OUTCOME Study foi sugerido que a empagliflozina possa ter influência direta no sistema cardiovascular.

Atualmente, três hipóteses procuram explicar a melhora dos desfechos cardiovasculares da empagliflozina (Bertero et al., 2018): 1) efeito diurético (glicosúria) associado a inibição da SGLT2 e subsequente redução da carga hemodinâmica para o ventrículo esquerdo (McMurray, 2016); 2) alteração no metabolismo cardíaco; e 3) restauração da homeostase de cálcio e sódio nos cardiomiócitos. Grande foco tem sido colocado em relação ao papel da empagliflozina no metabolismo cardíaco (Mudaliar et al., 2016).

O coração saudável obtém 95% de sua energia da fosforilação mitocondrial oxidativa de ácidos graxos (60%) e carboidratos (40%) (Mudaliar et al., 2016; Glatz et al., 2020). No coração insuficiente, assim como no organismo com diabetes, ocorre alterações no perfil das contribuições dos substratos energéticos no metabolismo oxidativo miocárdico (Labbe et al., 2012; Opie et al., 2012; Glatz et al., 2020). Nessas condições, ocorre aumento na utilização de ácidos graxos em relação à glicose. Esse aumento do uso de ácidos graxos eleva o custo energético e reduz a eficiência cardíaca, aumentando assim o risco de disfunção ventricular (Mudaliar et al., 2016). O aumento da oxidação de ácidos graxos também está associado a lipotoxicidade e a maior produção de EROs com efeitos deletérios na função mitocondrial e outros processos celulares (Mudaliar et al., 2016).

Por mecanismo ainda não completamente esclarecido, a empagliflozina aumenta a mobilização e oxidação de lipídeos no fígado, o que resulta em aumento da cetogênese (Suzuki et al., 2014; Yokono et al., 2014; Ferrannini et al., 2016). Acredita-se que este efeito seja causado por aumento da concentração sérica de glucagon e redução da concentração de insulina (Lytvyn et al., 2017). Consequentemente, no miocárdio ocorre redução do uso de ácidos graxos e aumento da utilização de corpos cetônicos, particularmente do β -hidroxibutirato, que apresenta maior eficiência metabólica que a oxidação de ácidos graxos (Ferrannini et al., 2016; Mudaliar et al., 2016). A captação miocárdica de β -hidroxibutirato é independente de insulina (Ferrannini et al., 2016). A concentração plasmática de β -hidroxibutirato aumenta em jejum e após alimentação, tanto em indivíduos diabéticos como voluntários normais após a administração de empagliflozina. Além de possuir maior eficiência metabólica, a oxidação de β -hidroxibutirato aumenta a atividade anti-oxidativa *in vitro* (Shimazu et al., 2013). A capacidade do miocárdio de consumir corpos cetônicos encontra-se preservada na IC (Aubert et al., 2016). Apesar de atrativa, há questões ainda não respondidas em relação a esta hipótese como, por exemplo, se o aumento da oxidação de corpos cetônicos é benéfico para o coração insuficiente e se a melhora do combustível para o miocárdio resulta em melhora da função cardíaca.

Os resultados benéficos com os inibidores da SGLT2 permitiram levantar a hipótese que esta classe de medicação possa ter efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular também na ausência de diabetes como na presença de IC como em situações de alto risco cardiovascular (Lytvyn et al., 2017). Recentemente, dois grandes ensaios clínicos investigaram o impacto da inibição da SGLT2 em pacientes com IC. Os estudos DAPA-HF

com a dapagliflozina (McMurray et al., 2019) e EMPEROR-Reduced com empagliflozina (Packer et al., 2020) observaram redução do desfecho combinado morte cardiovascular ou hospitalização por IC, em pacientes com IC de fração de ejeção reduzida, com ou sem diabetes mellitus.

Poucos investigadores avaliaram as ações dos inibidores da SGLT2 sobre o processo de remodelação cardíaca experimental. Em peixes-zebra com IC, a empagliflozina atenuou as alterações cardíacas estruturais e morfológicas (Shi et al., 2017). Em ratos com infarto do miocárdio, a dapagliflozina reduziu o estresse oxidativo e atenuou a infiltração de miofibroblastos dentro de um mês pós-infarto (Lee et al., 2017). Santos-Gallego et al. (2019) induziram infarto agudo do miocárdio em porcos e trataram com empagliflozina por dois meses. Os autores observaram melhora de variáveis estruturais e funcionais do ventrículo esquerdo, bem como efeito benéfico no estresse oxidativo e no metabolismo energético do miocárdio.

Dessa forma, são escassos os estudos que avaliaram os efeitos de inibidores da SGLT2 sobre parâmetros de função ventricular após processo de remodelação cardíaca. Portanto, para melhor interpretar os resultados clínicos e caracterizar os efeitos da inibição sobre o sistema cardiovascular, há necessidade de estudos que avaliem os mecanismos envolvidos nos efeitos da inibição da SGLT2 sobre o processo de remodelação cardíaca.

Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da empagliflozina sobre o coração de ratos submetidos a processo de remodelação cardíaca induzida por infarto do miocárdio. Especificamente, foram avaliados as estruturas e função cardíaca, os marcadores do estresse oxidativo e o metabolismo miocárdico.

Material e Métodos

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso corporal entre 200 e 250 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Botucatu. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Cento e dezenove animais foram submetidos à cirurgia, sendo 44 para a cirurgia sem infarto (grupos SHAM) e 75 para a cirurgia com infarto (IM).

O IM foi realizado de acordo com o método previamente descrito em nosso laboratório (Martinez et al., 2011). Em resumo, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (60 mg/kg) e morfina (5 mg/kg) por via intraperitoneal e submetidos a toracotomia lateral esquerda. Após exteriorização do coração, o átrio esquerdo foi afastado e a artéria descendente anterior esquerda ligada com fio mononylon 5.0 entre a saída da artéria pulmonar e o átrio esquerdo. Posteriormente, o coração foi reposicionado no tórax, os pulmões inflados com pressão positiva e o tórax fechado por sutura. Durante a cirurgia, os animais foram ventilados manualmente com oxigênio. Os ratos pertencentes ao grupo controle (SHAM) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem ligação da artéria coronária, responsável pela produção do infarto. A princípio foram constituídos dois grupos de animais: SHAM e infarto do miocárdio (IM).

Tratamento no Pós-operatório

Houve observação da recuperação dos ratos por 8 h durante o período pós-operatório imediato. No período pós-operatório, a dor foi tratada por administração de analgésicos dipirona sódica (300 mg/kg, misturada à água de beber) e tramadol (5 mg/kg, por via intraperitoneal, a cada 8 h), durante 72 h após a cirurgia.

Dez dias após a cirurgia, foi realizado ecocardiograma transtorácico para avaliar o tamanho do infarto. Ratos com infartos pequenos (menor de 30%) foram excluídos do estudo. A seguir, os ratos foram subdivididos em quatro grupos: 1) SHAM (n=22) - recebeu ração comercial e água *ad libitum*; 2) SHAM + empagliflozina (SHAM+EMP, n=22) – recebeu ração comercial com empagliflozina e água *ad libitum*; 3) IM (n=22) - recebeu ração comercial e água *ad libitum*; e 4) IM + empagliflozina (IM+EMP, n=22) – recebeu ração comercial com empagliflozina e água *ad libitum*. Os ratos dos grupos SHAM+EMP e IM+EMP receberam, diariamente, o inibidor da proteína cotransportadora de sódio-glicose

tipo 2 empagliflozina (Boehringer-Ingelheim), na concentração de 5 mg/kg/dia adicionada à ração, por 12 semanas.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais e mantidos em ambiente com temperatura ($24 \pm 2^\circ \text{C}$) e fotoperíodo (ciclos 12/12 h claro/escuro) controlados. O consumo de ração e água foram mensuradas duas vezes na semana para calcular o consumo médio diário. Ao final do período experimental, os ratos foram submetidos ao procedimento de eutanásia por dose elevada de tiopental (120 mg/kg, por via intraperitoneal).

Estudo Ecocardiográfico

Ecocardiogramas foram realizados 10 dias após a cirurgia para indução do IM e ao final do período experimental, de acordo com método previamente descrito (Gomes et al., 2016; Guizoni et al., 2016; Gimenes et al., 2018). Os ratos foram sedados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg, i.p.) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg, i.p.). Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. Foi utilizado o equipamento modelo Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Israel) equipado com transdutor multifrequencial de 5,0-11,5 MHz. Para realizar as medidas estruturais do coração, foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo-M) orientado pelas imagens em modo bidimensional, com o transdutor em posição para-esternal, eixo menor. A avaliação do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo foram obtidas posicionando o cursor do modo-M ao nível do plano da valva aórtica. As imagens obtidas no modo-M foram registradas em impressora modelo UP-895 (Sony, Japan). Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas, manualmente, com um paquímetro (Mitutoyo, Japan). As seguintes estruturas foram medidas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE; espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV), e diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A espessura relativa do VE (ERVE) foi calculada dividindo-se a EDPP multiplicada por dois pelo DDVE. A massa do VE (MVE) foi calculada pela fórmula $[(DDVE + EDPP + EDSIV)^3 - (DDVE)^3] \times 1,04$, onde 1,04 representa a densidade específica do miocárdio. O índice de MVE (IMVE) foi calculado normalizando a MVE para o peso corporal. A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico (% enc. endo) $[(DDVE - DSVE) / DDVE] \times 100$; 2) velocidade de

encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior. A função diastólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) pico de velocidade do enchimento diastólico inicial (onda E); 2) pico de velocidade do enchimento diastólico tardio (onda A); 3) razão entre as ondas E e A (E/A); 4) tempo de desaceleração da onda E (TDE); 3) tempo de relaxamento isovolumétrico em valores absolutos (TRIV) e normalizados pela frequência cardíaca ($TRIV_n = TRIV/R-R^{0,5}$). A avaliação conjunta da função diastólica e sistólica do VE foi realizada pelo índice de desempenho miocárdico, também conhecido por índice de Tei (soma do tempo de contração isovolumétrica e TRIV, dividido pelo tempo de ejeção do VE). O estudo foi complementado pela avaliação por Doppler tissular dos deslocamentos sistólico (S), diastólico inicial (E') e tardio (A') do anel mitral (média aritmética das velocidades de deslocamento das paredes lateral e septal), e pela razão entre as ondas E e E' (E/E').

Mensuração da Glicemia

As mensurações da glicemia foram realizadas aos quatro, oito e doze semanas do período experimental. As coletas de sangue foram realizadas durante o ciclo claro do biotério, sempre no mesmo horário, e os ratos com livre acesso à ração e água. Uma gota de sangue era obtida da cauda do animal e aplicada na fita de medição de glicose G-423S da Bioland, e a leitura era realizada no aparelho da marca Bioland modelo G-500.

Coleta de Tecidos para Análise

Um dia após a realização do ecocardiograma, os animais foram pesados e, a seguir, eutanasiados com injeção intraperitoneal de tiopental com dose elevada (120 ml/kg) seguido por decapitação. Após a coleta de sangue, o coração foi retirado por toracotomia mediana. Os átrios, o ventrículo direito (VD) e o ventrículo esquerdo (VE), incluindo o septo, foram dissecados e pesados separadamente. Após a pesagem, as amostras do coração foram congeladas em nitrogênio líquido e conservados a -80° C. O sangue foi centrifugado a 4° C; amostras de soro foram separadas e armazenadas a -80° C até o momento das dosagens.

Posteriormente, foram coletados e pesados os pulmões para avaliar grau de congestão pulmonar. Os pulmões e fragmentos do fígado, VE, VD e átrios foram pesados antes e após desidratação em estufa a 65° C por 72 horas para avaliar o grau de edema dos tecidos (Martinez et al., 2011).

Análise Histológica

Para análise da área de infarto, amostras anelares do VE foram fixadas em solução de formol a 10% por 24 h e, a seguir, lavadas em água corrente e transferidas para solução com etanol 70%. Para o cálculo do tamanho do infarto, foi realizado corte do VE na distância de 5 a 6 mm do ápice. Os valores obtidos nessa região correspondem à média dos valores obtidos em cortes de todo coração (Martinez et al., 2011). Os cortes histológicos foram corados em lâminas com *picrosirius red* e examinados em microscópio Leica DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a um computador dotado do programa Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). O tamanho do infarto foi determinado pela razão entre a soma dos comprimentos epicárdico e endocárdico do segmento infartado e a soma das circunferências epicárdica e endocárdica totais. O valor está expresso em porcentagem do VE.

Para a mensuração da fração de colágeno foram utilizadas as mesmas lâminas acima coradas com *picrosirius red* analisando a região do corte não infartada. Foram fotografadas 20 regiões diferentes de cada amostra utilizando a objetiva 40X do microscópio Leica DM LS. A quantificação foi realizada com o programa Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Utilizando a função “count/size”, era selecionada a região corada em vermelho que representava o colágeno. O programa, automaticamente, calculava a fração colágena intersticial miocárdica.

O trofismo miocárdico do VE foi avaliado por morfometria utilizando o tecido congelado da região não infartada. Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras de tecido foram transferidas para câmara de micrótomo criostato (-20° C), onde permaneceram por 20 a 30 min para estabelecimento do equilíbrio térmico. Os blocos de tecido muscular foram, então, fixados em suportes metálicos do criostato (JUNG CM 1800 - Leica) por pequenas quantidades de adesivo (OCT - Tissue Tek Compound) e orientados de modo que os cortes fossem feitos transversalmente à direção das fibras. Os cortes foram corados pelo método de hematoxilina e eosina. O diâmetro dos cardiomiócitos foi avaliado com o auxílio de microscópio, como previamente descrito. Em cada lâmina, foram utilizados 150 a 200 cardiomiócitos e as medidas foram realizadas no menor diâmetro passando pelo núcleo. Todas as análises histológicas foram realizadas no *software* Image Pro-plus, descrito acima, e por um mesmo examinador cego ao tratamento (Martinez et al., 2011; Gomes et al., 2016).

Avaliação do Estresse Oxidativo

Amostras do miocárdio do VE (cerca de 100 mg) foram descongeladas e homogeneizadas em Potter Elvehjem, com pistilo de teflon, com 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. Os homogenatos foram centrifugados a 9.000 g por 15 min, em centrífuga refrigerada a 4° C. O sobrenadante foi utilizado para determinação de proteínas totais e análise de atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e catalase (CAT) (Lowry et al., 1951). As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech (com software Swift II, England) e em leitor de microplaca (μQuant-MQX 200 com KC Junior software, Bio-Tek Instruments, USA) (Rosa et al., 2016). Todos os reagentes foram de procedência da Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Quantificação de hidroperóxido de lipídio

Parte do sobrenadante obtido para análise de atividade das enzimas antioxidantes foi utilizado para quantificação de hidroperóxido de lipídio. Através da oxidação do sulfato ferroso amoniacal (Fe^{2+}) na presença de alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato hidroxitolueno (BHT) em metanol à temperatura ambiente. O Fe^{3+} reage com o alaranjado de xilenol e forma cromógeno, cuja intensidade de coloração foi medida espectrofotometricamente (Jiang et al., 1991).

Avaliação do Metabolismo Energético no Miocárdio

Amostras do VE (aproximadamente 100 mg) foram coletadas e imediatamente estocadas a -80° C. O tecido foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 7,0) com auxílio de homogeneizador tipo *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g, durante 15 min, a -4° C (Pereira et al., 1998). O sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade das enzimas do metabolismo energético e complexos enzimáticos respiratórios. O metabolismo energético foi analisado através das seguintes enzimas reguladoras de vias metabólicas: fosfofrutoquinase (marcadora da glicólise), lactato desidrogenase (associada ao metabolismo anaeróbio), citrato sintase (importante reguladora do metabolismo aeróbio e controladora do fluxo de

metabólitos através do ciclo do ácido cítrico) e a β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (reguladora da β -oxidação de ácidos graxos). A atividade da fosfofrutoquinase foi determinada na presença de aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, triose isomerase, ATP e frutose-6-fosfato, e quantificada pela oxidação do NADH. A atividade da lactato desidrogenase foi determinada segundo técnica de Wilkinson utilizando o método UV otimizado, no qual foi medida a velocidade de consumo de NADH₂, que foi proporcional à atividade da enzima presente na amostra. A atividade da citrato sintase foi determinada a 412 nm em tampão tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo acetil-CoA, DTBN (dithiobis-2-nitrobenziato) e oxaloacetato. A atividade da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase foi determinada em meio contendo acetoacetil-CoA e NADH, o qual teve sua oxidação medida.

Análise da Função Mitocondrial por Meio da Atividade dos Complexos Respiratórios

Os *pellets* da primeira centrifugação do tecido cardíaco foram suspensos em tampão fosfato de sódio 0,1 M contendo 250 mM de sacarose, 2 mM de EDTA e 250 mM de manitol, centrifugados e ressuspensos, no qual se determinou a atividade da NADH-desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II) e ATP sintase.

A atividade da NADH-desidrogenase (complexo I) foi determinada segundo o método descrito por Singer (1974) por meio da velocidade de consumo de NADH, a 340 nm, em tampão fosfato de sódio (80 mM, pH 7,4) e EDTA (50 mM). A atividade da succinato desidrogenase (complexo II) foi determinada no sistema de reação constituído por tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,4) na presença de succinato de sódio (10 mM), fenazina metassulfato (0,36 mM) e diclorofenolindofenol (12 mM). As leituras foram obtidas a 340 nm, de acordo com o método descrito por Fischer et al. (1985). A atividade da ATP sintase foi determinada em tampão tris-HCl na presença de cloreto de magnésio, NADH, fosfoenolpiruvato, ATP e lactato desidrogenase. As leituras foram realizadas a 340 nm. Todas as leituras foram realizadas em leitor de microplaca (μ Quant-MQX Bio-Tech Instruments, Winooski, VT, USA) com controle através do Software Gen5 2.0 (Bio-Tech Instruments, Winooski, VT, USA). Todos os reagentes foram de procedência da Sigma (St. Louis, USA).

As análises descritas nesta seção foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, sob orientação da Prof^a. Associada Ana Angélica H. Fernandes.

Análise Estatística

Os resultados são apresentados em média e desvio padrão ou mediana e percentis. A comparação entre os grupos foi realizada por análise de variância de duas vias (ANOVA) complementada pelo teste de Student-Newman-Keuls. O tamanho do infarto foi comparado pelo teste t de Student para amostras independentes. Para comparar as frequências foi usado o teste de Goodman. O nível de significância considerado foi de 5%.

Resultados

Entre os animais do estudo, nenhum caso de morte foi observado naqueles que foram submetidos à cirurgia sem obstrução coronariana. Por outro lado, nos animais que sofreram infarto, 27 morreram durante o procedimento cirúrgico ou no período pós-operatório de 48 horas. Dos 48 ratos sobreviventes com infarto, quatro foram descartados por não apresentarem, ao ecocardiograma inicial, infarto acima de 30% do ventrículo esquerdo.

Durante o período de seguimento, os grupos IM e IM+EMP apresentaram quatro e cinco mortes, respectivamente. Nenhum óbito foi observado nos grupos sem infarto. A Figura 1 mostra a porcentagem de ratos sobreviventes no decorrer do tratamento.

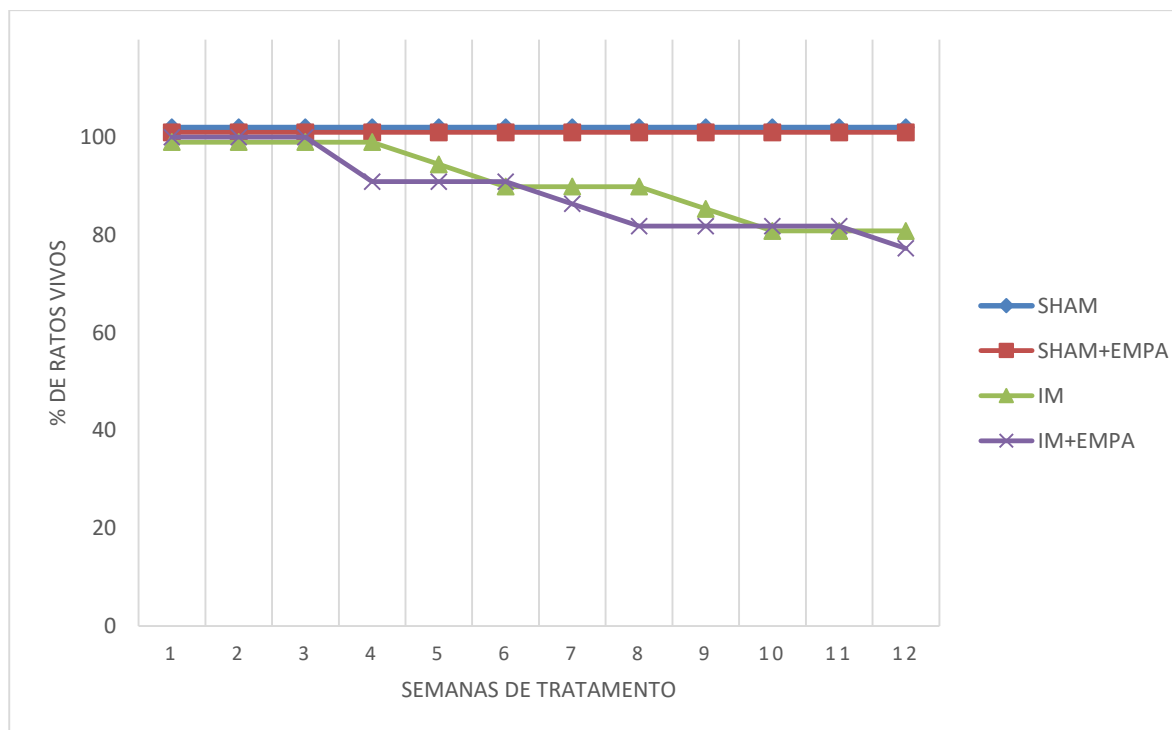


Figura 1. Porcentagem de ratos que sobreviveram no decorrer do tratamento; SHAM: sem infarto e sem medicamento; SHAM+EMP: sem infarto e com empagliflozina; IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina.

Durante o período experimental foram registrados os consumos de alimento, água, peso corporal e glicemia. A Tabela 1 apresenta o consumo médio diário de ração durante as

12 semanas de tratamento. No primeiro mês, o grupo SHAM+EMP passou a consumir mais alimento. A partir do segundo mês, os grupos que consumiam ração com medicamento passaram a consumir mais. No final do período de tratamento os grupos continuavam consumindo mais e também o grupo IM passou a consumir mais em relação ao grupo SHAM.

Tabela 1. Consumo diário médio de ração (g) durante o período de tratamento

	SHAM	SHAM+EMP	IM	IM+EMP
4ª semana	27,8 (23,2-28,0)	30,7 (28,8-31,4)*	28,0 (26,8-29,5)	29,6 (27,1-31,8)
8ª semana	24,8 (23,3-26,9)	28,9 (28,1-30,4)*	25,7 (24,9-26,9)	28,8 (27,7-31,1) [§]
12ª semana	24,7 ± 1,38	30,1 ± 2,00*	27,0 ± 1,36*	30,5 ± 1,52 [§]

Dados expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75%. SHAM: sem infarto e sem medicamento; SHAM+EMP: sem infarto e com empagliflozina; IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina. Análise estatística: ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. *: p<0,05 vs. SHAM; §: p<0,05 vs. IM.

Na Tabela 2 está apresentado o consumo médio diário de água durante as 12 semanas de tratamento. Em todo período experimental os grupos que consumiram o medicamento, SHAM+EMP e IM+EMP, ingeriram mais água em relação aos grupos sem medicamento, SHAM e IM.

Tabela 2. Consumo diário médio de água (mL) durante o período de tratamento

	SHAM	SHAM+EMP	IM	IM+EMP
4ª semana	41,1 (37,5-43,1)	48,6 (45,0-55,3)*	42,2 (41,1-44,2)	52,8 (42,8-58,6) [§]
8ª semana	36,2 (33,4-38,4)	43,2 (40,2-45,4)*	36,8 (35,7-37,6)	42,7 (39,7-46,1) [§]
12ª semana	37,8 ± 3,17	42,7 ± 3,80*	38,8 ± 2,13	44,8 ± 5,30 [§]

Dados expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75%. SHAM: sem infarto e sem medicamento; SHAM+EMP: sem infarto e com empagliflozina; IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina. Análise estatística: ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. *: p<0,05 vs. SHAM; §: p<0,05 vs. IM.

A Tabela 3 mostra a glicemia durante o período de tratamento. Na 4ª semana o grupo IM+EMP apresentou um valor mais elevado ao comparar com os outros grupos. Na 8ª semana, os grupos tratados com empagliflozina, SHAM+EMP e IM+EMP, estavam mais elevados, e o grupo IM teve redução na glicemia em relação ao grupo SHAM. Na semana final de tratamento os grupos com tratamento com a empagliflozina (SHAM+EMP e

IM+EMP) apresentaram valores mais elevados em relação aos grupos SHAM e IM, respectivamente.

Tabela 3. Glicemia (mg/dL) durante o período de tratamento

	SHAM	SHAM+EMP	IM	IM+EMP
4ª semana	105 (98-110)	107 (98-110)	109 (99-116)	112 (109-123) ^{#§}
8ª semana	97 (91-106)	110 (100-118)*	93 (88-100)*	106 (98-114) [§]
12ª semana	93 (87-102)	116 (103-138)*	95 (90-102)	109 (100-161) [§]

Dados expressos em mediana e percentis 25 e 75%. SHAM: sem infarto e sem medicamento; SHAM+EMP: sem infarto e com empagliflozina; IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina. Análise estatística: ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. *: $p < 0,05$ vs. SHAM; #: $p < 0,05$ vs. SHAM+EMP; §: $p < 0,05$ vs. IM.

A Tabela 4 apresenta os valores do peso corporal (PC) dos ratos antes da cirurgia e durante o período experimental. Não houve diferença entre os grupos no início e ao final do período de estudo. Duas semanas após a indução do infarto do miocárdio, o PC dos grupos IM e IM+EMP era maior em relação aos respectivos controles. Após 4 semanas, o grupo IM ainda se mantinha maior que o grupo SHAM e IM+EMP. Na 8ª semana e ao final do estudo, o PC não se mostrou diferente entre os grupos. A Figura 2 ilustra a evolução do PC durante o período experimental.

Tabela 4. Progressão de peso corporal (g) dos ratos durante o período experimental

	SHAM	SHAM+EMP	IM	IM+EMP
Antes da cirurgia de indução do IM	200 ± 21	200 ± 15	211 ± 15	209 ± 19
Duas semanas de pós-operatório	239 ± 21	240 ± 19	258 ± 26*	257 ± 25 [#]
4ª semana de tratamento	373 ± 31	363 ± 27	397 ± 35*	368 ± 30 [§]
8ª semana de tratamento	417 ± 41	416 ± 41	443 ± 44	420 ± 43
12ª semana de tratamento	461 ± 48	470 ± 50	495 ± 54	464 ± 40

Dados expressos em média e desvio padrão. SHAM: sem infarto e sem medicamento; SHAM+EMP: sem infarto e com empagliflozina; IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina. Análise estatística: ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. *: $p < 0,05$ vs. SHAM; #: $p < 0,05$ vs. SHAM+EMP; §: $p < 0,05$ vs. IM.

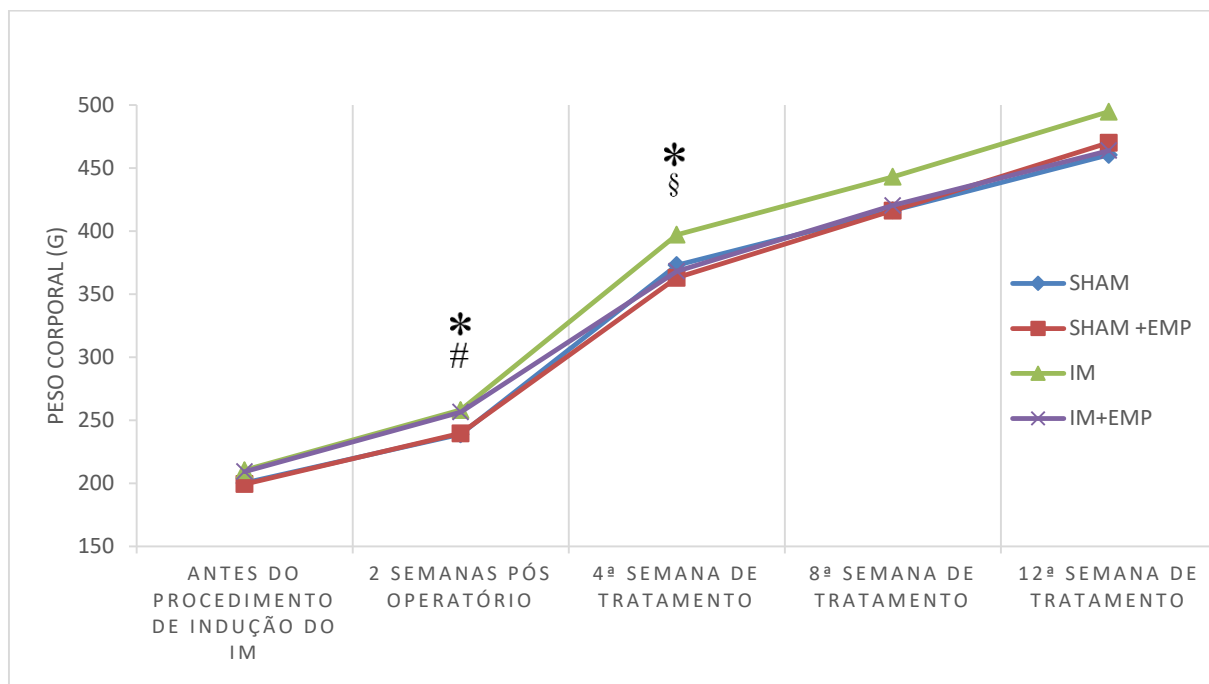


Figura 2. Progressão de peso corporal (g) dos ratos durante o período experimental: SHAM: sem infarto e sem medicamento; SHAM+EMP: sem infarto e com empagliflozina; IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina. Análise estatística: ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. *: SHAM vs. IM ($p < 0,05$); #: SHAM+EMP vs. IM+EMP ($p < 0,05$); §: IM vs. IM+EMP ($p < 0,05$).

Na Tabela 5 estão apresentadas as variáveis estruturais cardíacas, e nas Tabelas 6, 7 e 8 as variáveis funcionais do VE, obtidas por ecocardiograma ao final do período experimental. Os animais que apresentaram frequência cardíaca acima de 330 batimentos por minuto foram excluídos do estudo ecocardiográfico, devido à dificuldade de analisar as variáveis estruturais e funcionais cardíacas nessa condição. Assim, no estudo ecocardiográfico, foram analisados 16 animais em cada um dos grupos SHAM e 13 animais em cada um dos grupos IM.

Os grupos com infarto mostram dilatação do VE e do átrio esquerdo e aumento da espessura e massa do VE em relação aos respectivos controles. O diâmetro diastólico do VE e a massa do VE foram menores no grupo SHAM+EMP em relação ao grupo SHAM. Em

relação ao átrio esquerdo, a empagliflozina mostrou efeito benéfico por diminuir o seu diâmetro no grupo IM+EMP vs. IM.

Funcionalmente, os grupos infartados apresentaram disfunção sistólica do VE, caracterizada pela redução da porcentagem de encurtamento endocárdico, da velocidade de encurtamento da parede posterior e da fração de ejeção. Observa-se também comprometimento da performance miocárdica global (aumento do índice de Tei). A empagliflozina não causou melhora da função sistólica e da performance miocárdica do VE. Em relação à função diastólica, o infarto causou aumento do tempo de desaceleração da onda E mitral e do TRIV normalizado, e a empagliflozina não foi capaz de melhorar esses índices. A avaliação funcional com o Doppler tissular também mostrou, nos grupos com infarto, disfunções sistólica (ondas S menores) e diastólica (ondas E' menores, ondas A' menores e relação E/E' média aumentadas). A empagliflozina não foi capaz de melhorar esses índices.

A Tabela 9 mostra as variáveis corporais e cardíacas dos quatro grupos. As variáveis PC, VD, a relação VD/PC e os pesos úmido/seco dos átrios, pulmão e fígado não diferiram entre os grupos. A massa do VE e dos átrios e o conteúdo de água do VE foram maiores nos grupos infartados. O peso úmido/seco do VD foi menor no grupo SHAM+EMP em relação aos grupos SHAM e IM+EMP.

A Tabela 10 mostra a frequência de sinais clínicos e patológicos de IC nos ratos infartados. O grupo tratado com o medicamento apresentou frequência inferior de efusão pleural. Não houve diferença significativa entre os grupos na frequência de taquipneia, trombo no átrio esquerdo, congestão hepática e ascite.

Tabela 5. Avaliação ecocardiográfica final dos parâmetros estruturais do coração

	SHAM (n=16)	SHAM+EMP (n=16)	IM (n=13)	IM+EMP (n=13)
PC (g)	462 ± 36	463 ± 34	508 ± 56*	468 ± 42§
DDVE (mm)	8,49 (7,90-8,58)	7,91 (7,74-8,09)*	10,5 (9,73-10,8)*	10,3 (9,42-11,1)#
DDVE/PC (mm/kg)	17,8 (16,7-19,1)	16,8 (16,5-18,2)	20,3 (18,6-23,1)*	22,4 (20,2-24,2)#
DSVE (mm)	4,05 (3,72-4,64)	3,80 (3,13-4,18)	8,34 (7,66-8,63)*	7,97 (6,91-8,88)#
EDPP (mm)	1,41 (1,39-1,45)	1,43 (1,39-1,45)	1,78 (1,67-2,06)*	1,74 (1,58-2,06)#
EDSIV (mm)	1,42 (1,41-1,45)	1,43 (1,41-1,45)	1,70 (1,60-1,84)*	1,58 (1,45-1,76)#
AO (mm)	4,10 (4,01-4,16)	4,06 (4,01-4,16)	3,83 (3,72-3,94)*	3,94 (3,83-3,94)#
AE (mm)	5,68 (5,47-5,89)	5,57 (5,47-5,69)	8,10 (7,01-8,43)*	6,79 (6,06-7,65)§
AE/AO	1,37 (1,33-1,43)	1,38 (1,32-1,41)	2,11 (1,78-2,24)*	1,72 (1,53-1,92)#§
AE/PC (mm/kg)	12,1 (11,6-13,4)	11,9 (11,5-12,6)	15,6 (13,0-18,0)*	14,8 (12,5-16,5)#
Massa VE (g)	0,84 (0,78-0,90)	0,77 (0,74-0,81)*	1,67 (1,45-1,86)*	1,54 (1,30-1,78)#
Índice MVE (g/kg)	1,78 (1,66-1,94)	1,71 (1,59-1,81)	3,46 (2,85-3,86)*	3,47 (2,75-3,70)#

Dados expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75%. SHAM: sem infarto e sem medicamento; SHAM+EMP: sem infarto e com empagliflozina; IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina. PC: peso corporal; DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo. Análise estatística: ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. *: p<0,05 vs. SHAM; #: p<0,05 vs. SHAM+EMP; §: p<0,05 vs. IM.

Tabela 6. Avaliação ecocardiográfica final da função sistólica do ventrículo esquerdo

	SHAM (n=16)	SHAM+EMP (n=16)	IM (n=13)	IM+EMP (n=13)
FC (bpm)	261 ± 25	254 ± 29	257 ± 26	253 ± 28
% enc.endo	50,3 ± 4,66	53,5 ± 6,49	20,7 ± 3,86*	22,6 ± 6,95#
VEPP (mm/s)	41,5 (39,9-44,7)	41,9 (39,5-47,9)	25,9 (21,8-33,9)*	24,2 (22,9-31,7)#
Tei	0,44 (0,41-0,55)	0,45 (0,40-0,51)	0,73 (0,63-0,84)*	0,76 (0,65-0,85)#
FE	0,88 (0,84-0,90)	0,89 (0,86-0,93)	0,50 (0,44-0,55)*	0,56 (0,42-0,63)#

Dados expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75%. SHAM: sem infarto e sem medicamento; SHAM+EMP: sem infarto e com empagliflozina; IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina. FC: frequência cardíaca; % enc.endo: porcentagem de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; Tei: índice de performance miocárdica; FE: fração de ejeção. Análise estatística: ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. *: p<0,05 vs. SHAM; #: p<0,05 vs. SHAM+EMP.

Tabela 7. Avaliação ecocardiográfica final da função diastólica do ventrículo esquerdo

	SHAM (n=16)	SHAM+EMP (n=16)	IM (n=13)	IM+EMP (n=13)
E mitral (cm/s)	72,5 (68,0-81,0)	75,0 (73,3-79,5)	76,0 (72,5-104)	76,0 (71,0-85,0)
A mitral (cm/s)	45,5 (38,5-55,3)	43,5 (38,5-47,5)	48,0 (16,5-53,8)	45,0 (36,0-56,5)
E/A	1,54 (1,51-1,80)	1,75 (1,53-1,87)	1,52 (1,33-6,22)	1,49 (1,34-2,10)
TDE (ms)	26,0 (24,5-30,0)	26,0 (22,5-26,0)	30,0 (28,0-35,0)*	33,0 (30,0-37,0)#
TRIV (ms)	48,0 (42,8-56,0)	49,0 (43,0-51,5)	45,0 (30,0-48,8)	55,0 (43,0-60,0)
TRIVn (ms)	57,2 (49,6-60,3)	51,2 (48,2-53,3)*	64,8 (59,1-69,7)*	70,7 (60,6-76,3)#

Dados expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75%. SHAM: sem infarto e sem medicamento; SHAM+EMP: sem infarto e com empagliflozina; IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina. E/A: razão entre picos de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TRIVn: TRIV normalizado pela frequência cardíaca. Análise estatística: ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. *: p<0,05 vs. SHAM; #: p<0,05 vs. SHAM+EMP.

Tabela 8. Avaliação das funções sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo pela Doppler-ecocardiografia tissular

	SHAM (n=16)	SHAM+EMP (n=16)	IM (n=13)	IM+EMP (n=13)
S lateral	3,78 ± 0,37	3,71 ± 0,34	2,83 ± 0,40*	2,93 ± 0,46#
S septal	3,69 ± 0,37	3,72 ± 0,36	2,72 ± 0,43*	2,76 ± 0,47#
S média	3,74 ± 0,33	3,72 ± 0,29	2,77 ± 0,36*	2,84 ± 0,42#
E' lateral	3,98 ± 0,66	3,80 ± 0,48	2,95 ± 0,68*	2,99 ± 0,54#
E' septal	3,98 ± 0,70	4,01 ± 0,55	3,28 ± 0,67*	3,29 ± 0,47#
E' média	3,98 ± 0,62	3,90 ± 0,44	3,11 ± 0,62*	3,14 ± 0,34#
A' lateral	3,93 ± 1,02	3,81 ± 1,06	3,35 ± 0,87	2,95 ± 1,29#
A' septal	3,55 (3,03-4,30)	3,05 (2,53-3,68)	2,70 (2,35-3,55)*	2,40 (1,90-3,15)#
A' média	3,65 (3,31-4,55)	3,43 (2,75-3,99)	3,10 (2,70-3,50)*	2,50 (1,98-3,30)#
E/E'média	18,4 (17,7-19,4)	19,0 (17,3-21,3)	27,1 (21,4-30,7)*	25,3 (21,4-29,4)#

Dados expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75%. SHAM: sem infarto e sem medicamento; SHAM+EMP: sem infarto e com empagliflozina; IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina. S: velocidade máxima de deslocamento da parede do anel mitral; S média: média das velocidades do S lateral e S septal; E': velocidade máxima de deslocamento diastólico inicial do anel mitral; E' média: média das velocidades do E' lateral e E' septal; A': velocidade máxima de deslocamento diastólico tardio do anel mitral; A' média: média das velocidades do A' lateral e A' septal; E: pico de velocidade do fluxo transmitral de enchimento inicial. Análise estatística: ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. *: p<0,05 vs. SHAM; #: p<0,05 vs. SHAM+EMP.

Tabela 9. Parâmetros corporais e cardíacos dos animais

	SHAM (n=22)	SHAM+EMP (n=22)	IM (n=18)	IM+EMP (n=17)
PC (kg)	0,46 ± 0,05	0,47 ± 0,05	0,49 ± 0,05	0,46 ± 0,04
VE (g)	0,76 (0,71-0,81)	0,78 (0,71-0,84)	0,92 (0,79-1,00)*	0,86 (0,82-0,90)#
VE/PC (g/kg)	1,67 (1,63-1,72)	1,67 (1,54-1,81)	1,92 (1,59-2,03)*	1,80 (1,68-1,90)
VD (g)	0,27 (0,23-0,32)	0,25 (0,23-0,29)	0,30 (0,25-0,42)	0,26 (0,25-0,33)
VD/PC (g/kg)	0,59 (0,50-0,67)	0,56 (0,50-0,62)	0,62 (0,51-0,92)	0,58 (0,53-0,68)
Átrios (g)	0,12 ± 0,04	0,10 ± 0,03	0,18 ± 0,04*	0,16 ± 0,04#
Átrios/PC (g/kg)	0,26 ± 0,10	0,22 ± 0,07	0,36 ± 0,09*	0,35 ± 0,08#
VE úmido/seco	4,09 (3,99-4,20)	4,01 (3,86-4,19)	4,35 (4,08-4,50)*	4,33 (4,15-4,50)#
VD úmido/seco	4,20 (4,10-4,28)	4,08 (4,02-4,23)*	4,23 (4,08-4,41)	4,23 (4,17-4,26)#
Átrios úmido/seco	4,35 (3,80-4,70)	4,19 (3,86-4,62)	4,40 (3,79-4,77)	4,59 (3,72-4,80)
Pulmão úmido/seco	4,45 (4,20-4,72)	4,50 (4,06-4,60)	4,57 (4,38-4,78)	4,64 (4,38-4,79)
Fígado úmido/seco	3,17 (3,10-3,21)	3,15 (3,08-3,21)	3,13 (3,09-3,20)	3,13 (3,05-3,21)

Dados expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75%. SHAM: sem infarto e sem medicamento; SHAM+EMP: sem infarto e com empagliflozina; IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina; PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito. Análise estatística: ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. *: p<0,05 vs. SHAM; #: p<0,05 vs. SHAM+EMP.

Tabela 10. Frequência de sinais clínicos e patológicos de insuficiência cardíaca em ratos com infarto do miocárdio

	Frequência (%)	
	IM (n=18)	IM+EMP (n=17)
Taquipneia e respiração laboriosa	10	0
Trombo em átrio esquerdo	5	0
Efusão pleural	50	0*
Congestão hepática	0	0
Ascite	40	17,6

IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina. *: p<0,01 vs. IM (teste de Goodman).

A Figura 3 ilustra a porcentagem da área de infarto medida em corte histológico do VE. Não houve diferença entre os grupos em relação ao tamanho do infarto. A Figura 4 mostra cortes histológicos representativos do VE, corados com *picrosirius red*, para análise de área de infarto.

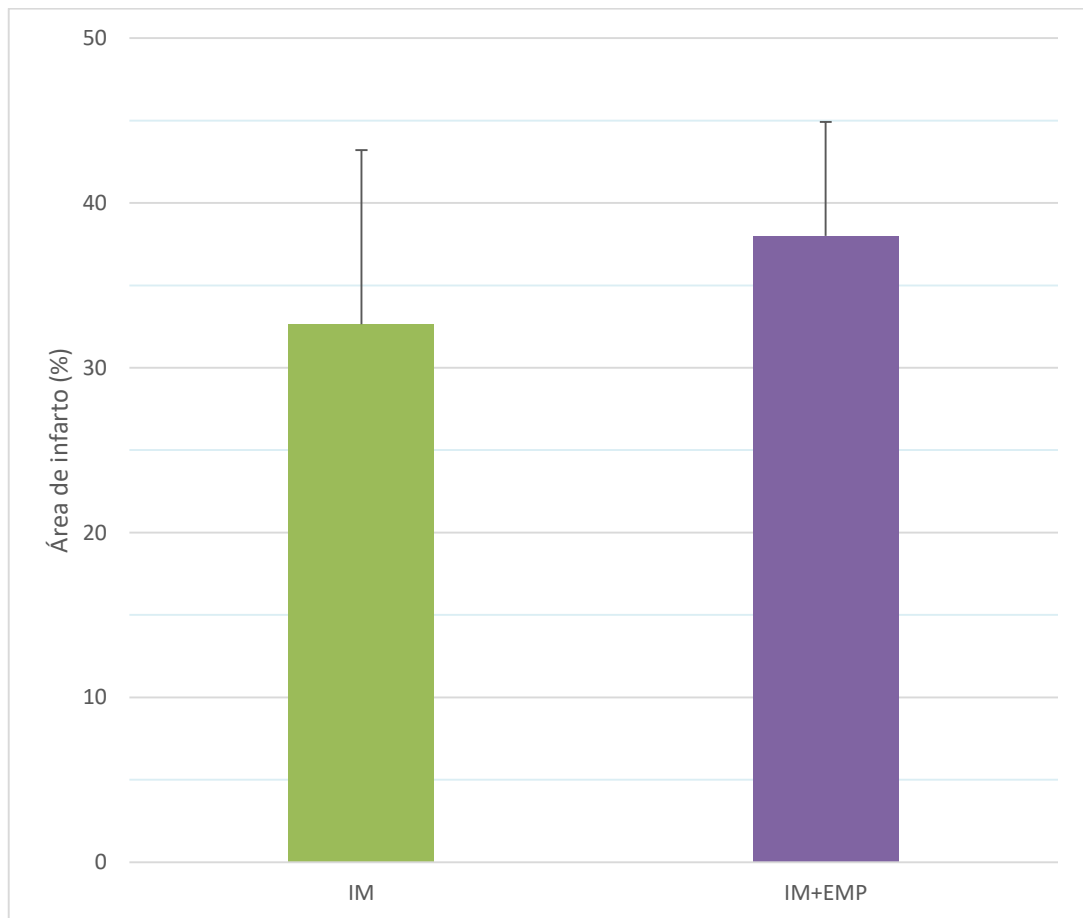


Figura 3. Porcentagem da área de infarto medida em corte histológico do ventrículo esquerdo. Dados expressos em média e desvio padrão. IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina; n=13.

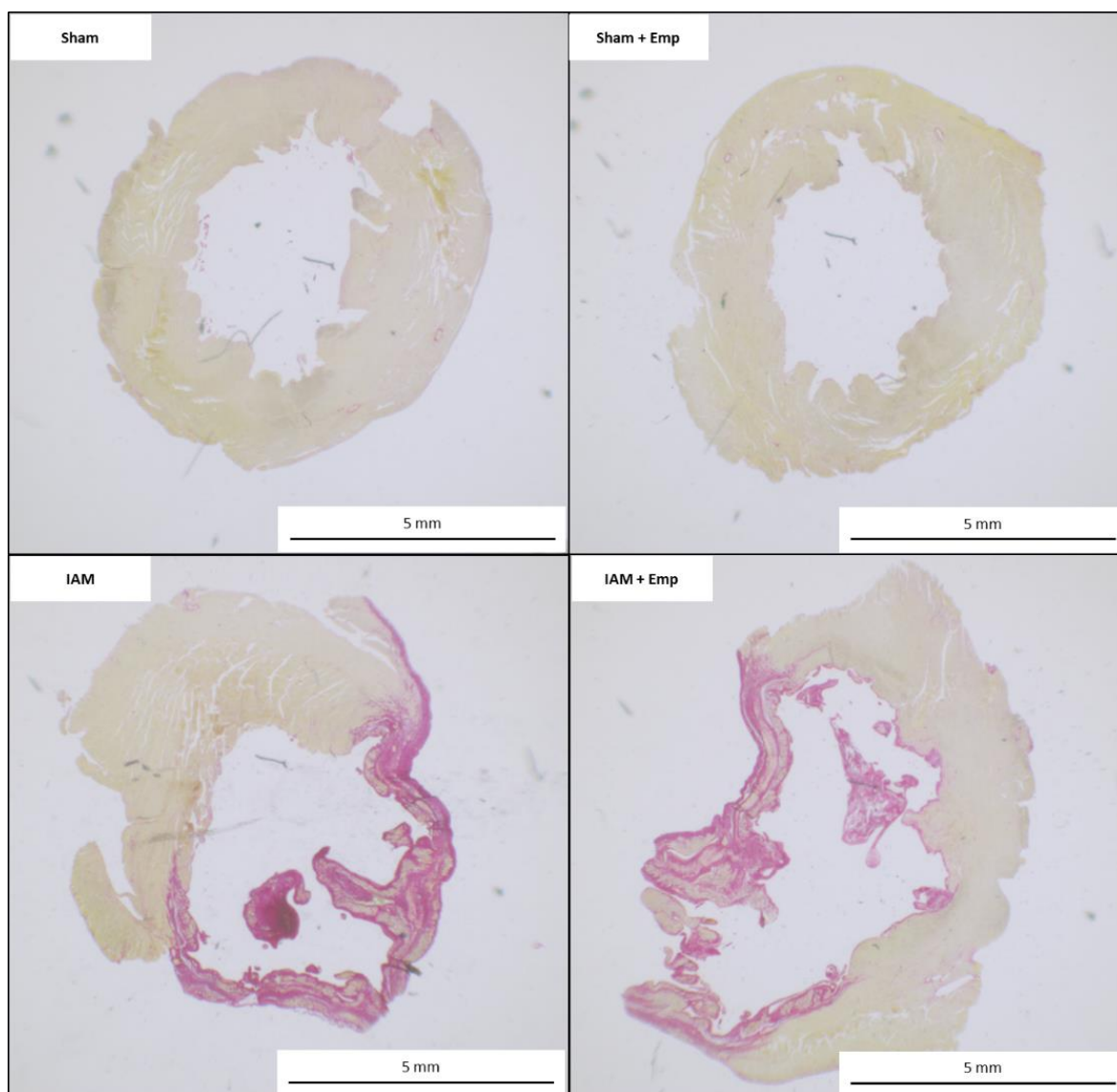


Figura 4. Cortes histológicos do ventrículo esquerdo para análise da área de infarto; Sham: sem infarto e sem medicamento; Sham+Emp: sem infarto e com empagliflozina; IAM: infarto do miocárdio sem tratamento; IAM+Emp: infarto do miocárdio com empagliflozina.

Os valores do diâmetro dos cardiomiócitos e da fração de colágeno intersticial estão apresentados na Tabela 11. Não houve diferença entre os grupos no diâmetro dos cardiomiócitos. O grupo IM mostrou maior fração de colágeno intersticial em relação ao grupo SHAM. A empagliflozina reduziu a fração de colágeno intersticial, no entanto, não apresentou diferença em relação ao grupo IM e ao grupo SHAM+EMP. Imagens representativas de cortes histológicos do VE, corados com hematoxilina e eosina, utilizados para mensuração do diâmetro dos cardiomiócitos, são apresentadas na Figura 5. Na Figura 6 são mostradas imagens obtidas das lâminas histológicas, coradas com *picrosirius red*, utilizadas para quantificação da fração de colágeno intersticial.

Tabela 11. Análises histológicas dos diâmetros dos miócitos e fração de colágeno do ventrículo esquerdo

	SHAM (n=8)	SHAM+EMP (n=8)	IM (n=8)	IM+EMP (n=8)
Diâmetro do miócito (µm)	14,9 ± 1,52	14,3 ± 1,05	14,7 ± 1,05	15,6 ± 2,65
Fração de colágeno intersticial (%)	3,87 ± 0,27	4,14 ± 0,35	4,50 ± 0,81*	4,37 ± 0,75

Dados expressos em média e desvio padrão. SHAM: sem infarto e sem medicamento; SHAM+EMP: sem infarto e com empagliflozina; IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. *: p<0,05 vs. SHAM.

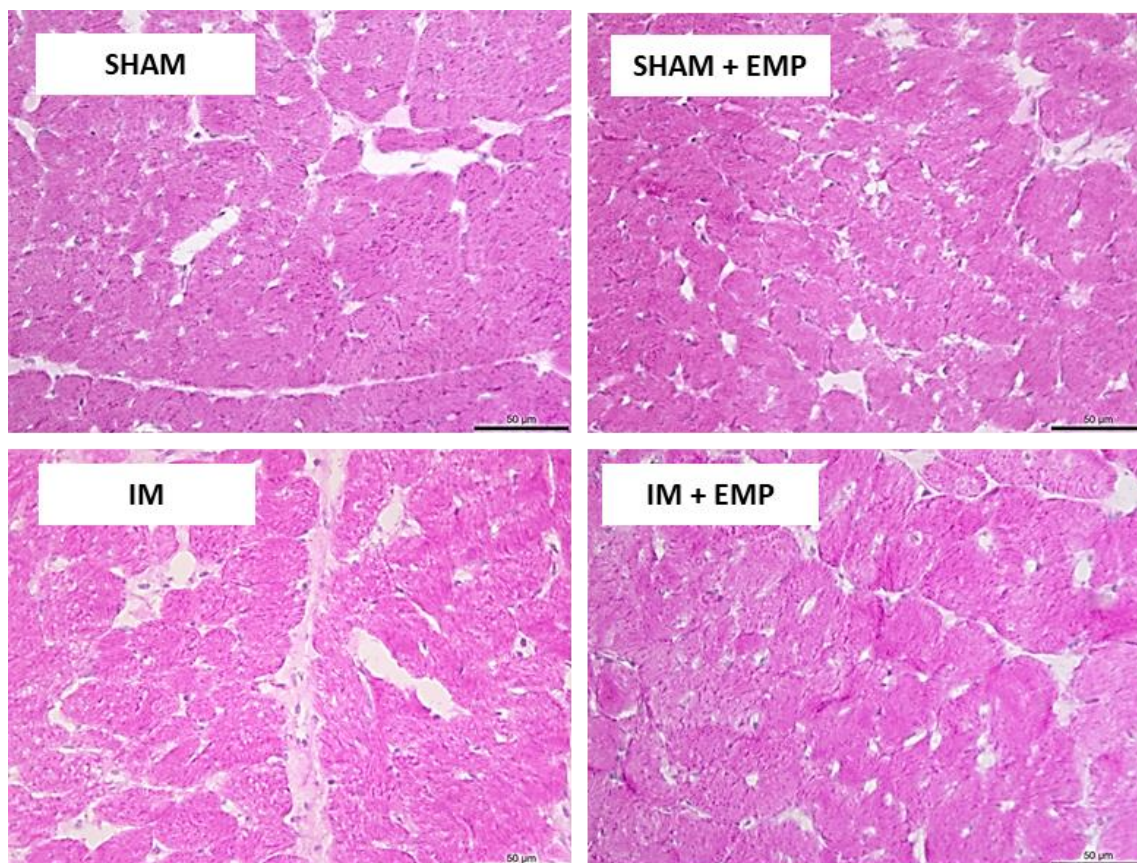


Figura 5. Cortes histológicos do ventrículo esquerdo corados com hematoxilina-eosina. SHAM: sem infarto e sem medicamento; SHAM+EMP: sem infarto e com empagliflozina; IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina; n=8 por grupo. Objetiva: 40X.

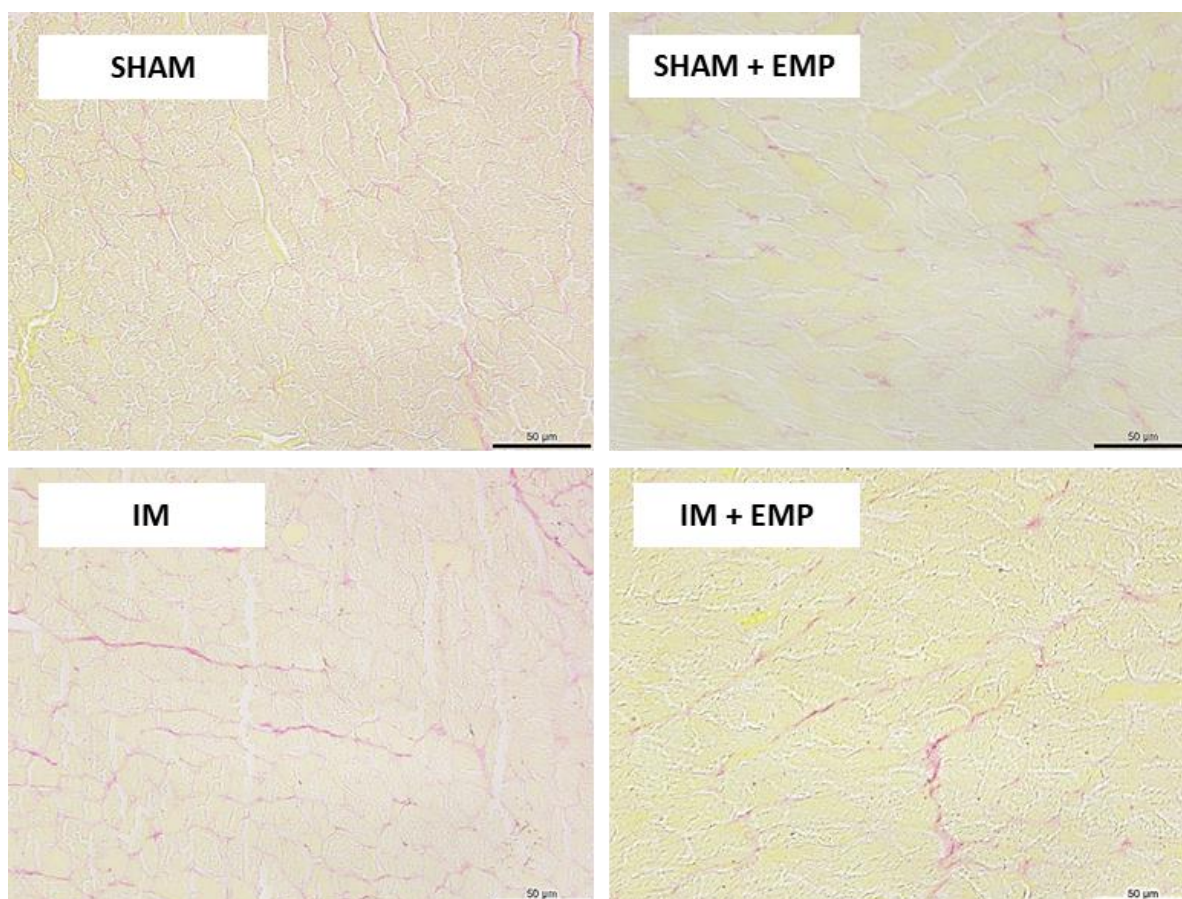


Figura 6. Cortes histológicos do ventrículo esquerdo corados com *picrosirius red*. SHAM: sem infarto e sem medicamento; SHAM+EMP: sem infarto e com empagliflozina; IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina; n=8 por grupo. Objetiva: 40X.

Na Tabela 12 estão expostos os valores referentes à análise do estresse oxidativo. A concentração de hidroperóxido de lipídio foi maior no grupo IM e foi normalizada no grupo IM+EMP. As enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase não apresentaram diferenças entre os grupos. A enzima glutatona peroxidase apresentou menor atividade nos dois grupos com infarto em relação aos respectivos grupos controles.

Os valores obtidos nas análises de metabolismo energético e o complexo respiratório do miocárdio do VE estão apresentados nas Tabelas 13 e 14, respectivamente. A fosfofrutoquinase não se mostrou diferente entre os grupos. Nos grupos com infarto, as enzimas lactato desidrogenase e citrato sintase apresentaram aumento significativo nas atividades enzimáticas e diminuição da beta-hidroxiacilCoA desidrogenase em relação aos grupos sem infarto. O complexo I apresentou-se mais ativa no grupo SHAM quando comparado aos grupos SHAM+EMP e IM. No complexo II, apenas o grupo SHAM+EMP esteve menos ativa em relação ao grupo SHAM.

Tabela 12. Estresse oxidativo do miocárdio do ventrículo esquerdo

	SHAM (n=8)	SHAM+EMP (n=8)	IM (n=8)	IM+EMP (n=8)
Hidrop. lip. (nmol/g de tecido)	143 ± 26	123 ± 20	183 ± 29*	137 ± 11 [§]
CAT (μmol/g tecido)	52,6 ± 11,2	47,6 ± 10,1	47,4 ± 7,71	45,3 ± 10,9
SOD (nmol/mg prot.)	6,04 ± 0,91	5,19 ± 0,71	5,75 ± 0,72	5,81 ± 0,90
GPX (nmol/mg tecido)	37,6 ± 6,14	40,8 ± 10,1	27,7 ± 6,61*	26,5 ± 6,80 [#]

Dados expressos em média e desvio padrão. SHAM: sem infarto e sem medicamento; SHAM+EMP: sem infarto e com empagliflozina; IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina; Hidrop. lip.: hidroperóxido de lipídeo; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; GPX: glutatona peroxidase. Análise estatística: ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. *: p<0,05 vs. SHAM; #: p<0,05 vs. SHAM+EMP; §: p<0,05 vs. IM.

Tabela 13. Metabolismo energético do miocárdio do ventrículo esquerdo

	SHAM (n=8)	SHAM+EMP (n=8)	IM (n=8)	IM+EMP (n=8)
PFK (nmol/min*mg prot)	158 ± 39	158 ± 36	186 ± 24	174 ± 32
LDH (μmol/min*mg prot)	45,2 ± 6,65	41,1 ± 9,33	58,4 ± 14,4*	55,7 ± 10,1 [#]
CS (nmol/min*mg prot)	30,4 ± 4,25	37,2 ± 4,85	45,8 ± 8,47*	46,5 ± 9,95 [#]
BHADH (nmol/min*mg prot)	24,0 ± 3,12	20,4 ± 4,84	16,9 ± 4,81*	14,4 ± 4,58 [#]

Dados expressos em média e desvio padrão. SHAM: sem infarto e sem medicamento; SHAM+EMP: sem infarto e com empagliflozina; IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina; PFK: fosfofrutoquinase; LDH: lactato desidrogenase; CS: citrato sintase; BHADH: β-hidroxiacil CoA desidrogenase. Análise estatística: ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. *: p<0,05 vs. SHAM; #: p<0,05 vs. SHAM+EMP; §: p<0,05 vs. IM.

Tabela 14. Complexo respiratório do miocárdio do ventrículo esquerdo

	SHAM (n=8)	SHAM+EMP (n=8)	IM (n=8)	IM+EMP (n=8)
Complexo I (nmol/mg pt)	26,2 ± 4,00	20,3 ± 2,99*	18,5 ± 3,17*	18,1 ± 4,10
Complexo II (nmol/mg pt)	9,45 ± 1,31	6,30 ± 1,85*	9,39 ± 2,82	8,37 ± 2,72
ATP Sintase (nmol/mg pt)	13,3 ± 1,94	11,8 ± 2,68	12,1 ± 1,46	11,6 ± 2,31

Dados expressos em média e desvio padrão. SHAM: sem infarto e sem medicamento; SHAM+EMP: sem infarto e com empagliflozina; IM: infarto do miocárdio sem tratamento; IM+EMP: infarto do miocárdio com empagliflozina. Análise estatística: ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. *: p<0,05 vs. SHAM.

Discussão

No presente estudo avaliamos a influência de um inibidor da SGLT2, empagliflozina, sobre a remodelação cardíaca e o metabolismo energético do miocárdio de ratos com infarto agudo do miocárdio. Os principais resultados foram o efeito benéfico da empagliflozina em reduzir a ocorrência de derrame pleural, o tamanho do átrio esquerdo e diminuir o estresse oxidativo.

Durante o período experimental, as progressões do peso corporal dos animais foram semelhantes em todos os grupos. Porém os valores de consumo de alimento e água foram maiores nos grupos com o medicamento. Para manter a mesma progressão de aumento do peso corporal, os animais dos grupos medicados passaram a consumir mais água para compensar o efeito diurético da empagliflozina. Além disso, devido a perda de glicose na urina, provavelmente os grupos tratados passaram a consumir maior quantidade de alimento.

Sabe-se que a glicose plasmática passa pelo glomérulo renal e a maior parte é reabsorvida no segmento S1 do túbulo contornado proximal pela proteína SGLT2. O restante da glicose é reabsorvida no segmento S2 e S3 do túbulo contornado proximal pela proteína SGLT1, resultando em urina sem glicose. As gliflozinas atuam inibindo a proteína SGLT2 com consequente redução da reabsorção de glicose resultando em glicosúria (Saisho, 2020; Boorsma et al., 2021). A glicosúria relacionada às gliflozinas tende a ocasionar perda de peso devido ao balanço energético negativo (Lytvyn et al., 2017; Pham et al., 2017; Saisho, 2020).

Considerando que um dos possíveis efeitos adversos do medicamento é a hipoglicemia, Levine (2017) frisa que a empagliflozina apresenta risco muito baixo de hipoglicemia desde que não seja utilizada juntamente com insulina e secretagogos de insulina. Em pacientes normoglicêmicos ou pré-diabéticos, o tratamento com empagliflozina não altera o nível da hemoglobina glicada e não aumenta o risco de hipoglicemia (Anker et al., 2021). No nosso estudo, não observamos hipoglicemia nos animais que receberam empagliflozina.

No modelo experimental de infarto utilizado neste estudo ocorrem dilatações do ventrículo esquerdo e do átrio esquerdo e comprometimento das funções sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo (Gonçalves et al., 2018). Somente em infartos pequenos essas alterações não ocorrem, razão pela qual ratos com infartos menores que 30% foram descartados logo após a cirurgia de indução de infarto (Gonçalves et al., 2018). A empagliflozina foi capaz de reduzir o diâmetro do átrio esquerdo. A redução do átrio

esquerdo poderia indicar melhora da função sistólica e/ou diastólica do ventrículo esquerdo. Como os índices funcionais não melhoraram, é provável que a redução do átrio esquerdo seja decorrente de redução do volume circulante, que é um efeito amplamente conhecido dos inibidores da SGLT2 (Cavaiola & Pettus, 2018; Chin et al., 2019). A redução do átrio esquerdo pode ser decorrente da melhora do quadro congestivo dos animais com infarto, corroborado pela ausência de ocorrência de derrame pleural nos ratos que receberam empagliflozina. Santos-Gallego et al. (2019) mostraram, em modelo de infarto em porcos, que a empagliflozina reduziu o tamanho do ventrículo esquerdo e melhorou a função sistólica, além de melhorar o metabolismo cardíaco (Santos-Gallego et al., 2019).

No presente estudo ficou evidente que a empagliflozina atenuou a frequência de derrame pleural. Cinquenta por cento dos animais com infarto que não receberam empagliflozina desenvolveram efusão pleural, enquanto que nenhum caso foi observado naqueles que receberam o tratamento. A efusão pleural é um dos sinais que podem ser observados na insuficiência cardíaca congestiva (Natanzon & Kronzon, 2009). A melhora desse sinal de insuficiência cardíaca pode ser explicada pela propriedade da empagliflozina de favorecer a diurese, natriurese, vasodilatação e redução da pressão arterial. Esses eventos podem resultar na diminuição da pré-carga e pós-carga, com consequente melhora no desempenho cardíaco, amenizando os sinais e sintomas congestivos da insuficiência cardíaca (Pham et al., 2017).

Entre os vários mecanismos responsáveis pelo efeito benéfico das glicoflozinas no coração, está o estresse oxidativo. O aumento do estresse oxidativo, que está presente no infarto do miocárdio, é responsável por uma série de alterações estruturais e funcionais do miocárdio (Hori & Nishida, 2009; Kayama et al., 2015; Gonçalves et al., 2018).

O estresse oxidativo consiste no desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes (Gomes et al., 2020). Em nosso trabalho, os principais agentes antioxidantes enzimáticos, a catalase e superóxido dismutase, não apresentaram diferença entre os grupos e houve redução da glutathione peroxidase nos grupos infartados. No entanto, houve redução do hidroperóxido de lipídio no grupo IM+EMPA quando comparado ao grupo IM.

O hidroperóxido de lipídio é o produto primário da reação que ocorre entre EROs e os ácidos graxos poli-insaturados, formando o composto reativo que pode danificar estruturas celulares (Eaton et al., 2001).

No nosso estudo, houve diminuição no estresse oxidativo, mas não se pode afirmar que foi devido à melhora dos agentes antioxidantes. Estudos sugerem que uma possível explicação seria a redução da atividade em subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase (Bedard & Krause, 2007).

A NADPH oxidase, composto pelas subunidades NOX, é um complexo enzimático que transfere elétrons através da membrana celular. O aceptor final desses elétrons é o oxigênio, formando principalmente a ERO superóxido. O aumento da atividade da NOX está relacionado a diversos tipos de patologias, incluindo doenças cardiovasculares. Em estudo com camundongos diabéticos, a empagliflozina reduziu a atividade da NOX4, atenuando o estresse oxidativo em modelo de miocardiopatia diabética (Li et al., 2019). Em estudo de síndrome cardiorrenal, em modelo de miocardiopatia dilatada em ratos, o tratamento com a gliflozina reduziu a expressão proteica de NOX1 e NOX2 (Yang, 2019). Yurista et al. (2019) observaram em modelo experimental semelhante ao nosso, com ratos infartados não diabéticos, redução na expressão da NOX2 em animais tratados com empagliflozina.

Acredita-se que um dos principais mecanismos do efeito benéfico das gliflozinas sobre o miocárdio esteja relacionado ao metabolismo miocárdico (Cavaiola & Pettus, 2018; Chin et al., 2019). Em nosso estudo, não observamos alterações significantes da empagliflozina sobre as variáveis analisadas.

A produção de energia no coração pode ser provida pelos substratos de ácidos graxos, corpos cetônicos, carboidratos e aminoácidos. Aproximadamente 95% da produção de energia em um coração saudável é por meio da oxidação mitocondrial, e o substrato mais utilizado é o ácido graxo que contribui com aproximadamente 50-70% da produção de ATP. A utilização de determinado substrato pode variar segundo a demanda do órgão e a disponibilidade do substrato. Porém em um coração com insuficiência cardíaca, a produção de ATP é reduzida em aproximadamente 30-40%, alterando o mecanismo de produção de energia (Kolwicz et al., 2013; Greenwell et al., 2020).

O processo de utilização de carboidratos é chamado de glicólise, em que há quebra de moléculas de glicose, composta por 10 etapas e intermediados por enzimas, e o seu desfecho pode ser o encaminhamento para a produção de energia mitocondrial ou formando lactato. Durante o processo, a glicose é convertida em frutose-6-fosfato. Na etapa seguinte, a enzima fosfofrutoquinase (PFK) transfere um fosfato de uma ATP formando a frutose-1,6-bifosfato mais uma ADP (Gibb & Hill, 2018). Após sua formação, a frutose-1,6-bifosfato é

dividida em 2 partes, intermediada por enzimas, até a formação do ácido pirúvico. No nosso estudo, a PFK apresentou aumento em sua atividade nos grupos com infarto, mas não atingiu diferença estatística. A elevação dessa enzima indica aumento da glicólise. Estudos têm mostrado que na remodelação cardíaca a atividade da enzima PFK está aumentada e a oxidação do piruvato diminuída ou inalterada (Bertero & Maack, 2018).

Após a formação do piruvato, essa molécula pode ter dois caminhos, como foi descrito por Lehninger et al. (2014). Em condições aeróbias o piruvato é catalisado para acetil e, em condições de hipóxia ou anaerobiose, é catalisado para lactato pela enzima lactato desidrogenase (LDH).

Em casos de insuficiência cardíaca de causa isquêmica há alterações nas contribuições dos substratos energéticos utilizados. Devido a menor disponibilidade de oxigênio, a glicólise torna-se mais representativa na produção de energia (Jaswal et al., 2011; Glatz et al., 2020). Em nosso trabalho, a enzima LDH apresentou valores de maior atividade nos grupos com infarto, contudo não foi atenuada pela empagliflozina.

Para a formação de acetil a partir do piruvato, o complexo enzimático piruvato desidrogenase descarboxila a molécula formando o acetil. A seguir, o acetil é ligado à coenzima-A formando o composto acetil-CoA (Greenwell et al., 2020).

A β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (BHADH) apresentou menor atividade nos grupos com infarto em nosso estudo. Essa enzima participa do processo de formação de acetil utilizando o NAD⁺ para oxidar o L- β -hidroxiacil-CoA à β -cetoacil-CoA (Lehninger et al., 2014).

Em nosso estudo, a citrato sintase (CS) apresentou maior atividade nos grupos com infarto. Essa enzima é um marcador da capacidade oxidativa da mitocôndria que atua na reação da acetil-CoA com o oxalacetato, formando citrato e coenzima-A, sendo a primeira etapa do ciclo de Krebs (de Castro et al., 2014; Fourny et al., 2019). Na insuficiência cardíaca, em fases mais avançadas, ocorrem alterações no metabolismo energético, gerando mais EROs, maior utilização da glicólise e menor participação de ácidos graxos. Também pode ocorrer menor atividade nas enzimas responsáveis pelo ciclo de Krebs e complexos respiratórios (Torres et al., 2019). Em nosso estudo evidenciamos diminuição da enzima que participa da oxidação dos ácidos graxos, mas houve aumento na atividade da enzima responsável pelo ciclo de Krebs. No presente modelo, o foco foi na remodelação cardíaca

pós infarto e não na insuficiência cardíaca. Assim, em muitos animais com infarto estudados não havia sinais evidentes de insuficiência cardíaca avançada.

O aumento da atividade da CS indica maior atividade mitocondrial nos grupos com infarto. Nos nossos dados, em animais infartados, a elevação da PFK sinaliza glicólise e a redução da BHADH menor contribuição dos ácidos graxos na produção de energia. No entanto, os seus valores não atingiram significância estatística.

Em nosso estudo, o complexo respiratório apresentou algumas diferenças estatísticas, mas no final do processo a ATP sintase não apresentou diferença estatística entre os grupos. O complexo I apresentou maior atividade apenas no grupo SHAM. A atividade do grupo SHAM+EMP não diferiu do grupo IM+EMP. Também no complexo II, o grupo SHAM+EMP teve redução em sua atividade quando comparado ao grupo SHAM.

Na cadeia respiratória, o complexo I transfere o H^+ para ubiquinona e o íon é bombeado para o complexo III, e o NADH volta a ser NAD^+ . No complexo II, o $FADH_2$ transfere para ubiquinona os hidrogênios que são encaminhados para o complexo III. A seguir, esses íons são bombeados para o complexo IV que catalisa a redução de oxigênio molecular para formação de água. Finalmente a ATP sintase ressintetiza o $ADP + P_i$ em ATP (Guyton & Hall, 2017; Fiedorczuk & Sazanov, 2018; Sousa et al., 2018).

O presente estudo apresenta limitações descritas a seguir. Uma delas é sobre o mecanismo que resultou na redução do estresse oxidativo. Avaliamos as enzimas antioxidantes e um marcador do estresse oxidativo. Em nossos resultados, as atividades das enzimas antioxidantes não aumentaram com o tratamento, porém houve redução do marcador de estresse oxidativo, o que sugere a participação de outras vias do estresse oxidativo. Outra limitação está relacionada ao início do tratamento com a empagliflozina. O tratamento foi iniciado 10 dias após a indução do infarto para realizar o ecocardiograma e formar grupos o mais homogêneo possível em relação ao tamanho do infarto. O início do tratamento mais precoce poderia mostrar resultados mais expressivos na atenuação dos efeitos deletérios da remodelação cardíaca causada pelo infarto.

Conclusão

No modelo de infarto do miocárdio em ratos não diabéticos, a empagliflozina diminui o diâmetro do átrio esquerdo, diminui o estresse oxidativo e evita a ocorrência de derrame pleural que é um dos sinais de insuficiência cardíaca congestiva.

Referências

Aimo A, Castiglione V, Borrelli C, Saccaro LF, Franzini M, Masi S, et al. Oxidative stress and inflammation in the evolution of heart failure: From pathophysiology to therapeutic strategies. *Eur J Prev Cardiol*. 2020;27:494-510.

Altenhofer S, Radermacher KA, Kleikers PW, Wingler K, Schmidt HH. Evolution of NADPH oxidase inhibitors: selectivity and mechanisms for target engagement. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23:406-27.

Anker SD, Butler J, Filippatos G, Khan MS, Marx N, Lam CSP, et al. Effect of empagliflozin on cardiovascular and renal outcomes in patients with heart failure by baseline diabetes status: Results from the EMPEROR-Reduced Trial. *Circulation*. 2021;143:337-49.

Aubert G, Martin OJ, Horton JL, Lai L, Vega RB, Leone TC, et al. The failing heart relies on ketone bodies as a fuel. *Circulation*. 2016;133:698-705.

Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiac remodeling: concepts, clinical impact, pathophysiological mechanisms and pharmacologic treatment. *Arq Bras Cardiol*. 2016;106:62-9.

Bertero E, Maack C. Metabolic remodelling in heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15:457-70.

Bertero E, Prates Roma L, Ameri P, Maack C. Cardiac effects of SGLT2 inhibitors: the sodium hypothesis. *Cardiovasc Res*. 2018;114:12-8.

Boorsma EM, Beusekamp JC, Ter Maaten JM, Figarska SM, Danser AHJ, van Veldhuisen DJ, et al. Effects of empagliflozin on renal sodium and glucose handling in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2021;23:68-78.

Butler J, Hamo CE, Filippatos G, Pocock SJ, Bernstein RA, Brueckmann M, et al. EMPEROR Trials Program. The potential role and rationale for treatment of heart failure with sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors. *Eur J Heart Fail*. 2017;19:1390-400.

Cavaiola TS, Pettus J. Cardiovascular effects of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2018;11:133-48.

Chin KL, Ofori-Asenso R, Hopper I, von Lueder TG, Reid CM, Zoungas S, et al. Potential mechanisms underlying the cardiovascular benefits of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors: a systematic review of data from preclinical studies. *Cardiovasc Res*. 2019;115:266-76.

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;35:569-82.

Cowie MR, Fisher M. SGLT2 inhibitors: mechanisms of cardiovascular benefit beyond glycaemic control. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17:761-72.

de Castro Brás LE, Cates CA, DeLeon-Pennell KY, Ma Y, Iyer RP, Halade GV, et al. Citrate synthase is a novel in vivo matrix metalloproteinase-9 substrate that regulates mitochondrial function in the postmyocardial infarction left ventricle. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21:1974-85.

Eaton P, Hearse DJ, Shattock MJ. Lipid hydroperoxide modification of proteins during myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res*. 2001;51:294-303.

Ferrannini E, Baldi S, Frascerra S, Astiarraga B, Heise T, Bizzotto R, et al. Shift to fatty substrates utilization in response to sodium-glucose cotransporter-2 inhibition in subjects without diabetes and patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2016;65:1190-5.

Ferrannini E, Mark M, Mayoux E. CV protection in the EMPA-REG OUTCOME trial: a “thrifty substrate” hypothesis. *Diabetes Care*. 2016;39:1108-14.

Fioretto P, Giaccari A, Sesti G. Efficacy and safety of dapagliflozin, a sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor, in diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2015;14:142.

Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta*. 1985;153:23-36.

Fitchett D, Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Hantel S, Salsali A, et al. EMPA-REG OUTCOME Trial Investigators. Heart failure outcomes with empagliflozin in patients with type 2 diabetes at high cardiovascular risk: results of the EMPA-REG OUTCOME trial. *Eur Heart J*. 2016;37:1526-34.

Fiedorczuk K, Sazanov LA. Mammalian mitochondrial complex I structure and disease-causing mutations. *Trends Cell Biol*. 2018;28:835-67.

Fourny N, Lan C, Séré E, Bernard M, Desrois M. Protective effect of resveratrol against ischemia-reperfusion injury via enhanced high energy compounds and eNOS-SIRT1 expression in type 2 diabetic female rat heart. *Nutrients*. 2019;11:105.

Gibb AA, Hill BG. Metabolic coordination of physiological and pathological cardiac remodeling. *Circ Res*. 2018;123:107-28.

Gilbert RE. Sodium-glucose linked transporter-2 inhibitors: potential for renoprotection beyond blood glucose lowering? *Kidney Int*. 2014;86:693-700.

Gimenes R, Gimenes C, Rosa CM, Xavier NP, Campos DHS, Fernandes AAH, et al. Influence of apocynin on cardiac remodeling in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17:15.

Glatz JFC, Nabben M, Young ME, Schulze PC, Taegtmeyer H, Luiken JJFP. Re-balancing cellular energy substrate metabolism to mend the failing heart. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866:165579.

Gomes MJ, Martinez PF, Campos DHS, Pagan LU, Bonomo C, Lima AR, et al. Beneficial effects of physical exercise on functional capacity and skeletal muscle oxidative stress in rats with aortic stenosis-induced heart failure. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8695716.

Gomes MJ, Pagan LU, Lima ARR, Reyes DRA, Martinez PF, Damatto FC, et al. Effects of aerobic and resistance exercise on cardiac remodelling and skeletal muscle oxidative stress of infarcted rats. *J Cell Mol Med*. 2020;24:5352-62.

Gonçalves AF, Polegato BF, Fernandes AA, Ishikawa LL, Okoshi K, Bazan SGZ, et al. Zinc supplementation attenuates cardiac remodeling after experimental myocardial infarction. *Cell Physiol Biochem*. 2018;50:353-62.

Greenwell AA, Gopal K, Ussher JR. Myocardial energy metabolism in non-ischemic cardiomyopathy. *Front Physiol*. 2020;11:570421.

Guizoni DM, Oliveira-Junior SA, Noor SL, Pagan LU, Martinez PF, Lima AR, et al. Effects of late exercise on cardiac remodeling and myocardial calcium handling proteins in rats with moderate and large size myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2016;221:406-12.

Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. Editora Elsevier. 13ª ed., 2017.

Heerspink HJL, Karasik A, Thuresson M, Melzer-Cohen C, Chodick G, Khunti K, et al. Kidney outcomes associated with use of SGLT2 inhibitors in real-world clinical practice (CVD-REAL 3): a multinational observational cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020;8:27-35.

Hori M, Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2009;81:457-64.

Jaswal JS, Keung W, Wang W, Ussher JR, Lopaschuk GD. Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation - A novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:1333-50.

Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*. 1991;26:853-56.

Kaplan A, Abidi E, El-Yazbi A, Eid A, Booz GW, Zouein FA. Direct cardiovascular impact of SGLT2 inhibitors: mechanisms and effects. *Heart Fail Rev*. 2018;23:419-37.

Kayama Y, Raaz U, Jagger A, Adam M, Schellinger IN, Sakamoto M, et al. Diabetic cardiovascular disease induced by oxidative stress. *Int J Mol Sci*. 2015;16:25234-63.

Kolwicz SC Jr, Purohit S, Tian R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res*. 2013;113(5):603-16.

Labbe SM, Grenier-Larouche T, Noll C, Phoenix S, Guerin B, Turcotte EE, et al. Increased myocardial uptake of dietary fatty acids linked to cardiac dysfunction in glucose-intolerant humans. *Diabetes*. 2012;61:2701-10.

Lee TM, Chang NC, Lin SZ. Dapagliflozin, a selective SGLT2 inhibitor, attenuated cardiac fibrosis by regulating the macrophage polarization via STAT3 signaling in infarcted rat hearts. *Free Radic Biol Med*. 2017;104:298-310.

Lehninger TM, Nelson DL, Cox MM. Princípios de Bioquímica. 6ª ed. Editora Artmed, 2014.

Levine MJ. Empagliflozin for type 2 diabetes mellitus: An overview of phase 3 clinical trials. *Curr Diabetes Rev*. 2017;13:405-23.

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;18:15.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.

Lytvyn Y, Bjornstad P, Udell JA, Lovshin JA, Cherney DZI. Sodium glucose cotransporter-2 inhibition in heart failure: potential mechanisms, clinical applications, and summary of clinical trials. *Circulation*. 2017;136:1643-58.

Marber MS, Rose B, Wang Y. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway – A potential target for intervention in infarction, hypertrophy, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51:485-90.

Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LA, Oliveira SAJ, Campos DH, Lima AR, et al. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *J Appl Physiol*. 2011;111:543-51.

McMurray J. EMPA-REG: the “diuretic hypothesis”. *J Diabetes Complications*. 2016;30:3-4.

McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE, Kober L, Kosiborod MN, Martinez FA, et al. Dapagliflozin in patients with heart failure and reduced ejection fraction. *N Engl J Med*. 2019;381:1995-2008.

Minze MG, Will K, Terrell BT, Black RL, Irons BK. Benefits of SGLT2 inhibitors beyond glycemic control - a focus on metabolic, cardiovascular, and renal outcomes. *Curr Diabetes Rev*. 2018;14:509-17.

Mudaliar S, Alloju S, Henry RR. Can a shift in fuel energetics explain the beneficial cardiorenal outcomes in the EMPA-REG OUTCOME study? A unifying hypothesis. *Diabetes Care*. 2016;39:1115-22.

Natanzon A, Kronzon I. Pericardial and pleural effusions in congestive heart failure - Anatomical, pathophysiologic, and clinical considerations. *Am J Med Sci*. 2009;338:211-6.

Neeland IJ, McGuire DK, Chilton R, Crowe S, Lund SS, Woerle HJ, et al. Empagliflozin reduces body weight and indices of adipose distribution in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res*. 2016;13:119-26.

Opie LH, Hasenfuss G. Mechanisms of cardiac contraction and relaxation. In *Braunwald's Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012:459-86.

Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Pocock SJ, Carson P, et al. Cardiovascular and renal outcomes with empagliflozin in heart failure. *N Engl J Med*. 2020;383:1413-24.

Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Zannad F. Effects of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors for the treatment of patients with heart failure: proposal of a novel mechanism of action. *JAMA Cardiol*. 2017;2:1025-9.

Pereira B, Costa-Rosa LF, Bechara EJ, Newsholme P, Curi R. Changes in the TBARS content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of adrenodemedullated rats. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31:827-33.

Pham D, Albuquerque Rocha N, McGuire DK, Neeland IJ. Impact of empagliflozin in patients with diabetes and heart failure. *Trends Cardiovasc Med*. 2017;27:144-51.

Rosa CM, Gimenes R, Campos DHS, Guirado GN, Gimenes C, Fernandes AAH, et al. Apocynin influence on oxidative stress and cardiac remodeling of spontaneously hypertensive rats with diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15:126.

Saisho Y. SGLT2 inhibitors: the star in the treatment of type 2 diabetes? *Diseases*. 2020;8:14.

Salim SV, Alvaro A, Emelia JB, Marcio SB, Clifton WC, April PC, et al. American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2020;141:e139-e596.

Santos-Gallego CG, Requena-Ibanez JA, San Antonio R, Ishikawa K, Watanabe S, Picatoste B, et al. Empagliflozin ameliorates adverse left ventricular remodeling in nondiabetic heart failure by enhancing myocardial energetics. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73:1931-44.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Principais causas de morte, 2017. Disponível em: <<http://svs.aims.gov.br/dantps/centrais-de-conteudos/paineis-de-monitoramento/mortalidade/gbd-brasil/principais-causas/>> acesso em: 22-11-2021.

Seo Y, Yamamoto M, Machino-Ohtsuka T, Ishizu T, Aonuma K. Effects and safety of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors in diabetes patients with drug-refractory advanced heart failure. *Circ J*. 2018;82:1959-62.

Shi X, Verma S, Yun J, Brand-Arzamendi K, Singh KK, Liu X, et al. Effect of empagliflozin on cardiac biomarkers in a zebrafish model of heart failure: clues to the EMPA-REG OUTCOME trial? *Mol Cell Biochem*. 2017;433:97-102.

Shimazu T, Hirschey MD, Newman J, He W, Shirakawa K, Le Moan N, et al. Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science*. 2013;339:211-4.

Singer TP. Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and alpha-glycerophosphate dehydrogenases. *Methods Biochem Anal*. 1974;22:123-75.

Sousa JS, D'Imprima E, Vonck J. Mitochondrial respiratory chain complexes. *Subcell Biochem*. 2018;87:167-227.

Suzuki M, Takeda M, Kito A, Fukazawa M, Yata T, Yamamoto M, et al. Tofogliflozin, a sodium/glucose cotransporter 2 inhibitor, attenuates body weight gain and fat accumulation in diabetic and obese animal models. *Nutr Diabetes*. 2014;4:e125.

Thomas MC. Renal effects of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2014;5:53-61.

Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *J Am Coll Cardiol*. 2018;72:2231-64.

Torres MJ, McLaughlin KL, Renegar RH, Valsaraj S, Whitehurst KS, Sharaf OM, et al. Intracardiac administration of ephrinA1-Fc preserves mitochondrial bioenergetics during acute ischemia/reperfusion injury. *Life Sci*. 2019;239:117053.

World Health Organization. The top 10 causes of death. Geneva, WHO, 2020. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>> acesso em: 23-01-2021.

Yang CC, Chen YT, Wallace CG, Chen KH, Cheng BC, Sung PH, Li YC, Ko SF, Chang HW, Yip HK. Early administration of empagliflozin preserved heart function in cardiorenal syndrome in rat. *Biomed Pharmacother*. 2019 Jan;109:658-670.

Yokono M, Takasu T, Hayashizaki Y, Mitsuoka K, Kihara R, Muramatsu Y, et al. SGLT2 selective inhibitor ipragliflozin reduces body fat mass by increasing fatty acid oxidation in high-fat diet-induced obese rats. *Eur J Pharmacol*. 2014;727:66-74.

Yurista SR, Silljé HHW, Oberdorf-Maass SU, Schouten EM, Pavez Giani MG, Hillebrands JL, et al. Sodium-glucose co-transporter 2 inhibition with empagliflozin improves cardiac

function in non-diabetic rats with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Eur J Heart Fail.* 2019;21:862-73.

Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, et al. EMPA-REG OUTCOME Investigators. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2015;373:2117-28.