



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

Ângelo Thompson Colombo Lo

**Influência da empagliflosina na remodelação cardíaca  
induzida pela exposição à fumaça de cigarros**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla

Coorientador: Profa. Dr. Dijon Henrique Salomé de Campos

Botucatu

2021

Ângelo Thompson Colombo Lo

Influência da empagliflosina na remodelação cardíaca  
induzida pela exposição à fumaça de cigarros.

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.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla

Coorientador: Prof. Dr. Dijon Henrique Salomé de Campos

Botucatu

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lo, Angelo Thompson Colombo.

Influência da empagliflosina na remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça de cigarros / Angelo Thompson Colombo Lo. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Paula Schmidt Azevedo Gaiolla

Coorientador: Dijon Henrique Salomé de Campos

Capes: 40101002

1. Remodelação ventricular. 2. Fumo. 3. Fumaça - Efeito fisiológico. 4. Metabolismo energético.

Palavras-chave: Empagliflosina; Fumo; Remodelação cardíaca.

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço ao Senhor Jesus, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, e as forças necessárias em prosseguir até sua conclusão.

Agradeço a minha orientadora Dra. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla pela orientação e preciosos ensinamentos, apoiou me e conseguiu me orientar e chegar até aqui, sendo um exemplo de profissionalismo e competência.

Meu coorientador Dr. Dijon Henrique de Campos Salomé pela ajuda desde o começo até o fim do mestrado, sem sua participação ativa comigo, foi quem esteve comigo me auxiliando e seus ensinamentos e disciplina me ajudaram, certamente se não fosse isso, eu não teria conseguido desenvolver meu projeto com tanta destreza.

A nutricionista doutora Mariana de Souza Dorna pela amizade, obrigado pelo apoio e companheirismo durante todo o mestrado.

Ao professor doutor Sergio Alberto Rupp de Paiva, pela competência e atenção comigo, obrigado pelo apoio e confiança em mim desde o começo.

Aos estagiários Thiago Yao Watanabe e Miguel Ossuna pela ajuda nas diversas etapas de todo o experimento, foi de grande valia.

Aos colegas de laboratório que me ensinaram muito, certamente cresci muito com a convivência e trabalho durante o mestrado.

# Epígrafe

**“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e o seus planos serão bem-sucedidos”.**

Provérbios 16.3

## SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	FUMO	1
1.2	REMODELAÇÃO CARDÍACA	1
1.3	EMPAGLIFLOSINA	3
1.4	EMPAGLIFLOSINA E REMODELAÇÃO CARDÍACA	4
2	OBJETIVOS	5
3	MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1	DELINEAMENTO	6
3.2	A EXPOSIÇÃO AO FUMO	7
3.3	ADMINISTRAÇÃO DA EMPAGLIFLOSINA	7
3.4	PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA	7
3.5	AVALIAÇÃO FUNCIONAL ECOCARDIOGRÁFICA	8
3.6	EUTANASIA DOS ANIMAIS	9
3.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA POR HEMATOXILINA	9
3.8	ESTUDO HISTOLÓGICO UTILIZANDO IMUNOFLUORESCÊNCIA	9
3.9	WESTERN BLOT	10
3.9.1	EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOCÁRDICAS	10
3.9.2	ELETROFORESE EM GEL	11
3.10	TRANSFERÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	11
3.11	ANTICORPOS PRIMÁRIOS E SECUNDARIOS	12
3.12	AVALIAÇÃO DA RESISTENCIA A INSULINA	12
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	12
4	RESULTADOS	13
5	DISCUSSÃO	19
6	CONCLUSÃO	24
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

## RESUMO

**Introdução:** A exposição à fumaça de cigarros aumenta o risco para doenças cardiovasculares, tais como hipertrofia e disfunção miocárdica, e entre outros problemas de saúde. A exposição a fumaça de cigarro também pode levar à resistência insulínica e alterações do metabolismo energético cardíaco. Frente a isso, justifica-se a investigação de terapia medicamentosa que possa atenuar esses danos. A literatura aponta que a empagliflosina (EMPA) tem se mostrado eficiente em atenuar a remodelação cardíaca, por meio de mecanismos ainda não conhecidos, mas que talvez possam se relacionar com vias metabólicas. O objetivo foi avaliar o papel desse medicamento na remodelação cardíaca induzida pela fumaça de cigarro, por meio da avaliação morfofuncional cardíaca e metabolismo energético. **Metodologia:** Foram utilizados 60 ratos wistar machos, com peso de 200-250 gramas, divididos C (controle) sem tratamento algum; grupo E (empagliflosina) que consumiram o medicamento; grupo F (exposto à fumaça de cigarros) composto por animais expostos a fumaça de cigarro e grupo FE (expostos ao fumo e receberam empagliflosina). As exposições ao fumo ocorriam 4 vezes ao dia, utilizados 10 cigarros para cada exposição, por 30 minutos e um intervalo de 10 minutos entre uma e outra, no total os animais passavam por 4 exposições diárias, por 60 dias. A administração de empagliflosina foi na dosagem de 10mg/kg peso corporal na ração produzida semanalmente. As análises in vivo foram pressão arterial e ecocardiograma; após foram feitas dosagens bioquímicas, como sódio, potássio, ácido úrico, lipoproteína de baixa densidade e triglicerídeos, análise histológica por hematoxilina, imunofluorescência e western blot para verificar a expressão da SIRT1, PCG $\alpha$  e PPAR $\alpha$ . Os dados foram analisados por teste “t” de Student e corrigidos por Bonferroni, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** Os animais expostos a fumaça de cigarros tiveram danos no coração, como hipertrofia concêntrica. A disfunção sistólica apresentada pelo ecocardiograma, através da % encurtamento endocárdico foi significativamente diferente entre os grupos Controle ( $59,8 \pm 2,2$ ) e Fumo ( $52,6 \pm 4,7$ ), assim como entre grupo Fumo ( $59,9 \pm 2,1$ ) e Fumo Empa ( $58,9 \pm 3,7$ ). Quanto a fração de Ejeção também houve diferença estatística entre os mesmos grupos: Controle ( $0,93 \pm 0,01$ ) e Fumo ( $0,93 \pm 0,0$ ), assim como entre Fumo ( $0,89 \pm 0,03$ ) e Fumo Empa ( $0,93 \pm 0,02$ ). Também foram encontradas disfunção diastólica avaliada pelo Tempo de Relaxamento Isovolumétrico corrigido pela Frequência Cardíaca TRIV R-R ( $49,1 \pm 8,1$  vs.  $52 \pm 4,3$  com  $p = 0,004$ ) e ( $64 \pm 11,4$  vs.  $52,3 \pm 6,4$   $p = 0,008$ ); e não foram

encontradas diferenças entre nos valores da glicemia, HOMA-IR, expressão das proteínas por western blot, parâmetros bioquímicos e histologia cardíaca. **Conclusão:** Portanto, a empagliflosina atenuou os efeitos tóxicos do cigarro no coração dos animais, preservando em estrutura e função cardíaca dos animais, porém as vias metabólicas investigadas não participaram desse processo.

**Palavras chave:** Fumo, empagliflosina, remodelação cardíaca.

## ABSTRACT

**Introduction:** Exposure to cigarette smoke increases the risk for cardiovascular diseases, such as hypertrophy and myocardial dysfunction, among other systemic health problems. Besides, it may lead to insulin resistance and metabolic abnormalities. Therefore, it is relevant to investigate medication that may attenuate this damage.

The literature has evidenced that empagliflozin (EMPA) is efficient in mitigating cardiac remodeling, possibly acting on energy metabolism. This study aimed to evaluate the role of empagliflozin in cardiac remodeling induced by cigarette smoke, cardiac morphofunctional assessment, and metabolic pathways. **Methodology:** 60 male Wistar rats weighing 200- 250 grams were used, divided between the Control, receiving empagliflozin, exposed to cigarette smoke and exposed to cigarette smoke, and receiving empagliflozin groups. The exposure of smoking occurred four times a day, and ten cigarettes were used for each exposure, for 30 minutes and a 10-minute interval between each other, for times per day, for 60 days. Empagliflozin was administered at a dosage of 10 mg/kg body weight in the ration weekly. Blood pressure and echocardiogram were performed in vivo; after that, biochemical measurements such as sodium, potassium, uric acid, low-density lipoprotein and triglycerides, and histological analysis hematoxylin, immunofluorescence, and western blot to check the expression of the SIRT 1, PGC $\alpha$  e PPAR $\alpha$ . The data were analyzed by the "t" test of Students and corrected by Bonferroni, with a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ). **Results:** Animals exposed to cigarette smoke had heart damage, such as concentric hypertrophy. The systolic dysfunction presented by the echocardiogram, through the% endocardial shortening, was significantly different between the Control ( $59.8 \pm 22$ ) and smoking ( $52.6 \pm 4.7$ ) groups, as well as between the smoking ( $59.9 \pm 2, 1$ ) and Empa Smoke ( $58.9 \pm 3.7$ ). Ejection fraction was different between the groups: Control ( $0.93 \pm 0.01$ ) and Smoke ( $0.93 \pm 0.0$ ), as well as between Smoke ( $0.89 \pm 0.03$ ) and Empa smoke ( $0.93 \pm 0.02$ ). Diastolic dysfunction assessed by Isovolumetric Relaxation Time corrected by isovolumetric relaxing time adjusted by heart rate ( $49.1 \pm 8.1$  vs.  $52 \pm 4.3$  with  $p = 0.004$ ) and ( $64 \pm 11.4$  vs.  $52.3 \pm 6.4$   $p = 0.008$ ); and no differences were found among glycemia, HOMA-IR, protein expression by western blot, biochemical parameters, and cardiac histology. **Conclusion:** Therefore, empagliflozin attenuated cigarettes' toxic effects on the animals' hearts, preserving the animals' cardiac structure and function.

**Keywords:** smoke, empagliflozin, cardiac remodeling

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Fumo

O hábito de fumar tabaco mata mais de 8 milhões de pessoas a cada ano, mais de 7 milhões dessas mortes são resultado do uso direto do tabaco; enquanto cerca de 1,2 milhão são resultado de não-fumantes expostos ao fumo passivo. Quase 80% dos 1,1 bilhão de fumantes do mundo vivem em países de baixa e média renda (OPAS, 2019).

Não existe um nível seguro de exposição à fumaça do tabaco, por sua vez em adultos, o fumo passivo provoca graves doenças cardiovasculares e respiratórias, incluindo doença coronariana e câncer de pulmão. Em crianças, anualmente 65 mil crianças morrem de doenças atribuíveis ao fumo passivo (OPAS, 2019). Fumaça de cigarros contém mais de quatro mil substâncias químicas, com potenciais efeitos tóxicos. A fumaça é composta por duas fases: particulada (condensada) que contém nicotina, água e alcatrão e gasosa que contém monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono, óxidos de nitrogênio, amônia, nitrosaminas voláteis, alcoóis, aldeídos e cetonas. Oxidantes e espécies reativas de oxigênio (EROS) são encontradas nas duas fases da fumaça, exercendo importante papel na fisiopatologia da lesão induzida pelo uso do cigarro. Portanto, aumento de estresse oxidativo, inflamação, apoptose, alterações no metabolismo energético são potenciais mecanismos envolvidos na lesão induzida pelo tabagismo (A, 2018).

## 1.2 Remodelação cardíaca

A remodelação cardíaca ocorre em resposta a alguma agressão cardíaca, como infarto do miocárdio, hipertensão arterial, doenças valvulares, estímulo tóxico, inflamatório, entre outros. Após alguma dessas agressões acontecem alterações genéticas (re-expressão de genes fetais), bioquímicas (alteração no metabolismo energético, estresse oxidativo, etc.), moleculares (alteração da expressão proteínas contrateis, etc), celulares (apoptose, hipertrofia, etc), intersticiais (fibrose, etc.) que levam a mudanças na forma, massa e geometria cardíaca, que por fim levam a disfunção diastólica e sistólica (MINICUCCI, 2010).

A exposição à fumaça de cigarros é um exemplo de agressão tóxica ao coração. A remodelação cardíaca desencadeada pelas toxinas da fumaça do cigarro é observada em modelos experimentais e clínicos (ZHOU, 2015; LIANG, 2012; KAPLAN, 2017). Em

estudos experimentais prévios, a fumaça de cigarro induziu diferentes padrões de geometria cardíaca; o padrão mais comum observado foi o normal, seguido da hipertrofia excêntrica (AZEVEDO, 2010). Em outro estudo, a exposição à fumaça de cigarros levou a hipertrofia concêntrica (AZEVEDO et al., 2020) Envolvidos na remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça de cigarros, não relacionada à hipertensão arterial ou isquemia estão o estresse oxidativo, alterações adrenérgicas, alterações no metabolismo energético, entre outros. As alterações morfológicas apresentadas no trabalho, mostrou piora dos parâmetros das funções sistólica e diastólica (MINICUCCI, 2016).

Em relação ao metabolismo energético, observou-se redução da síntese de ATP (adenosina trifosfato) e problemas na cadeia respiratória mitocondrial em animais expostos à fumaça de cigarros, que foi descrito pelo termo "Smoke cardiomyopathy" ou "Smoker's cardiomyopathy" (GVOZDJAKOVA, 1984). Outro estudo mais recente, mostrou que os efeitos tóxicos da fumaça de cigarros levaram ao aumento da atividade adrenérgica, hipertrofia concêntrica, disfunção sistólica e diastólica, alterações no metabolismo energético cardíaco compatíveis com resistência insulínica, caracterizados por maior índice de HOMA, menor concentração de GLUT4 na membrana e aumento da expressão da Sirtuina 1 (SIRT1) do estresse oxidativo e maior razão capilar/miócito (AZEVEDO et al.,2020).

Em condições normais a insulina se liga ao seu receptor na membrana plasmática celular, que se autofosforila e ativa. Em seguida fosforila uma proteína de acoplamento que recruta "phosphatidylinositol-3 kinase", PI3K, da membrana plasmática. Este conjunto ativa a proteína quinase B, Akt, que é um mediador central dos efeitos da insulina. A Akt-1 favorece a translocação do GLUT 4 para a membrana, permitindo a entrada da glicose. Adicionalmente Akt-1 inibe o metabolismo de ácidos graxos (WITTELES, 2008 apud PIRES, 2018).

Em condições patológicas, como na remodelação cardíaca, existe redução na oxidação de ácidos graxos e aumento da utilização de glicose. Ocorrendo principalmente nos estágios iniciais da remodelação cardíaca, como uma forma de proteger o coração. Isto se deve ao fato da oxidação dos ácidos graxos gastarem mais oxigênio por ATP gerado quando comparado com a glicose. Existe um estímulo para que Akt-1 favoreça a entrada de glicose no cardiomiócito, via GLUT-4, além da oxidação de ácidos graxos (WITTELESS, 2008, ABEL & DOENST, 2010).

Em estágios mais tardios da remodelação cardíaca, os ácidos graxos que não foram oxidados se acumulam no miocárdio sob a forma de triglicerídeos e ceramidas. Este acúmulo de lipídios intracardíaco configura a lipotoxicidade, que promove apoptose e disfunção cardíaca (WITTELES, 2008 apud PIRES, 2018).

Na presença de obesidade, diabetes, e tabagismo em que comumente observa-se resistência à insulina, não há captação adequada da glicose e, portanto, o processo de remodelação é semelhante ao descrito acima para estágios tardios da remodelação. Ou seja, existe maior captação de ácidos graxos, que se depositam parcialmente no miocárdio levando à lipotoxicidade. (WITTELES, 2008; AZEVEDO et al. 2020; KAPLAN, 2017; YAN, 2014).

### **1.3 Empaglifosina**

A empaglifosina é um medicamento com ação hipoglicemiante pela inibição da reabsorção de glicose pelo SGLT2 (transportador sódio-glicose) (TAHARA et al, 2016). O seu uso para tratamento da diabetes mellitus consiste na inibição da reabsorção de glicose pelo transporte ativo no gradiente dependente de sódio (CALADO&NUNES, 2015). Com a inibição do mecanismo, a glicose em excesso que não foi reabsorvida, é excretada na urina, portanto o uso da empaglifosina causa glicosúria.

Os SGLT1 e SGLT2, os seus membros mais conhecidos, desempenham um papel crucial na reabsorção de glicose do lúmen intestinal e tubular para o interior da célula epitelial. A reabsorção ativa de glicose do lúmen tubular para dentro da célula epitelial é levada a cabo via SGLT2 ou SGLT1, de localização apical, sendo que o posterior retorno à circulação é mediado por GLUT2 ou GLUT1, de expressão basolateral. O desenvolvimento clínico dos inibidores SGLT2 representou um importante avanço no tratamento individualizado do paciente com diabetes tipo 2 (CALADO&NUNES, 2015).

Os mecanismos envolvidos nessa cardioproteção permanecem por serem estabelecidos, mas talvez tenha a participação hemodinâmica, e da resistência insulínica com melhora da metabolização de ácidos graxos (ANSARY, 2017; MINZE, 2018).

Em um estudo com o medicamento, foi demonstrado uma redução significativa do risco de ocorrência de eventos cardiovasculares no grupo que recebeu a empaglifosina, independentemente da dose utilizada (10 mg ou 25 mg, uma vez por dia). Adicionalmente, verificou-se uma significativa redução de 32% no número de mortes por qualquer causa e de 35% nas hospitalizações por insuficiência cardíaca em pacientes que a receberam no tratamento. (ZINMAN, 2015 apud MONTEIRO et al, 2019).

Na literatura, se encontram evidências sobre ação desse medicamento com a redução da mortalidade, risco de morte cardiovascular ou hospitalização por insuficiência cardíaca e fração de ejeção reduzida. Redução do risco de eventos graves de insuficiência cardíaca em 30% (PACKER, M, 2019).

#### **1.4 Empaglifosina e a remodelação cardíaca**

Estudos experimentais mostraram redução da hipertrofia cardíaca com o inibidor de SGLT2. Em humanos observou-se redução de risco cardiovascular com seu uso, como mostra os ensaios clínicos EMPA-REG e REFORM (BUTLER, 2017; YE, 2017).

Os mecanismos envolvidos na cardioproteção permanecem por serem estabelecidos, mas talvez tenha a participação: 1) hemodinâmica, pelo efeito natriurético do medicamento; 2) da resistência insulínica, com melhora da metabolização de ácidos graxos; 3) da redução de estresse oxidativo e redução do ácido úrico; 4) da redução do peso; 5) da diminuição da inflamação, 6) da redução da rigidez arterial, entre outros (BUTTLER et al 2017; ANSARY, 2017; MINZE, 2018)

Em um estudo *in vitro*, pode avaliar os efeitos da empaglifosina sobre os parâmetros cardíacos, ela reduziu os danos da lipotoxicidade, reduziu a agregação plaquetária e inibição de trombose como potencial mecanismo envolvido na proteção cardiovascular mediada por inibidores do SGLT2 (SPIGONI, V. et al 2020).

Na literatura, se encontra evidencias que mostram a redução da lipotoxicidade induzida por dieta hiperlipídica, com o uso da empaglifosina (BENETTI, 2016).

Em um estudo clínico, os pacientes que receberam empaglifosina obtiveram uma associação significativa entre diminuição da PCR, e melhora no HOMA-IR sugerindo que aumento da sensibilidade à insulina e efeitos anti-inflamatórios (HATTORI, S, 2018).

O efeito hemodinâmico parece ser o mecanismo de ação mais comumente apontado como responsável pela proteção cardiovascular da empaglifosina, pela redução na pressão arterial e volume intravascular (ZINMAN, 2016 & PACKER, 2017 apud MONTEIRO, P et al, 2019).

Outra suposição é devido ao aumento da diurese, que poderia resultar na redução da volemia, redução da pré e pós-carga cardíaca, aumento da concentração sérica, e maior liberação de oxigênio nos tecidos; reduzindo do risco de insuficiência cardíaca (SATTAR, 2016 apud MONTEIRO, P et al, 2019).

Seus efeitos foram observados na redução da instalação e progressão da hipertrofia cardíaca e cardiomiopatia, explicada como resultado das alterações na reabsorção de sódio a nível gastrointestinal ou eventual otimização no metabolismo cardíaco (ZINMAN, 2016 apud MONTEIRO, P et al, 2019).

Outros autores apontam que as mudanças metabólicas cardíacas resultantes da ação da empagliflosina, com alteração metabólica com diminuição de utilização de lipídios e glicose e maior consumo de corpos cetônicos resultariam no aumento da eficácia do processo metabólico, da contratilidade e eficiência cardíaca (MUDALLAR, 2016 apud MONTEIRO, P et al, 2019). Adicionalmente, sugere-se que a empagliflosina possa reduzir o estresse oxidativo avaliado por meio da diminuição dos níveis de ácido úrico (BYRNE, NJ et al, 2017).

Considerando que a exposição à fumaça de cigarros induz remodelação cardíaca, com a participação de vários mecanismos, como hemodinâmicos, estresse oxidativo e metabolismo energético, justifica o estudo do papel da empagliflosina nesse modelo (BYRNE, NJ et al, 2017).

Mesmos em ratos não diabéticos, o medicamento foi administrado em apenas 2 semanas, na dosagem de 10 mg/kg/dia via gavagem e tem apresentado efeitos que protegeram o coração, como uma discreta redução da hipertrofia do coração, melhora função diastólica e manutenção da função cardíaca estável (BYRNE, NJ et al, 2017).

Embora a melhor estratégia ainda seja evitar o tabagismo, ainda existem muitos fumantes ativos justificando a investigação de estratégias que possam minimizar o dano cardíaco. Não foram encontrados estudos na literatura que relacionassem o uso de empagliflosina e cardiotoxicidade induzida pela exposição à fumaça de cigarros, que foi investigada nesse estudo.

## **2 OBJETIVO**

Avaliar o papel da empagliflosina na remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça de cigarros em ratos não diabéticos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Delineamento

Todas as experiências e procedimentos foram realizados de acordo com o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” published by the National Institutes of Health (NIH 1996) e aprovados pelo Comitê de Ética Animal de Botucatu (1281/2018).

Os ratos wistar machos adquiridos no Biotério Central da universidade. Posteriormente, foram colocados em um biotério para vermifugação e crescimento, conforme as normas de biossegurança do biotério da Unidade de Pesquisa Experimental. O confinamento prévio foi em uma caixa para 6 ratos, com alimentação e água a vontade ofertados pelo biotério; com temperatura controlada de 25°C e iluminação artificial. O controle de peso era feito semanalmente até atingir a média do peso corporal de 200 a 250 g.

Quando atingiram a média de peso desejada, os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: grupo C (controle) sem tratamento algum; grupo E (empagliflosina) que consumiram o medicamento; grupo F (exposto à fumaça de cigarros) composto por animais expostos a fumaça de cigarro e grupo FE (expostos ao fumo e receberam empagliflosina); que foram expostos ao fumo e a empagliflosina por cerca de 60 dias, conforme esquema abaixo:

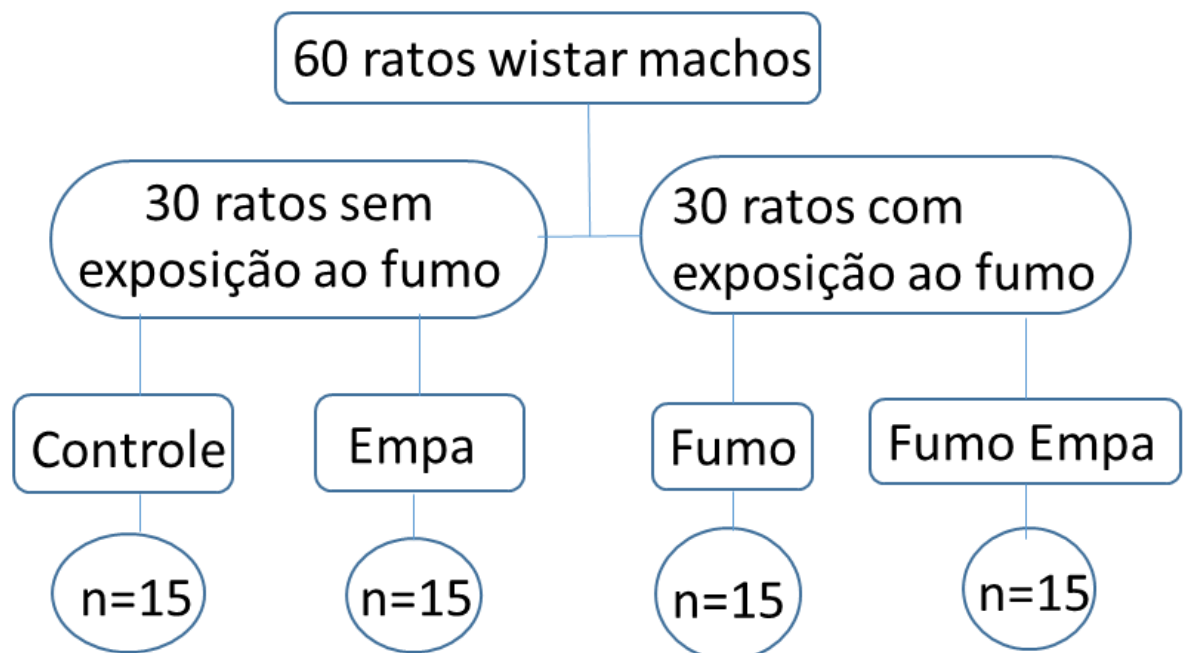


Figura 1- Desenho experimental

### **3.2 A exposição ao fumo**

Os animais foram expostos à fumaça de cigarro, colocados diariamente em câmara transparente, cujas medidas são, aproximadamente (95x80x65cm) por sua vez foi conectada ao dispositivo de sucção a vácuo do cigarro e lançar a fumaça as ambas as câmaras com os animais por 30 minutos. Após esse período, a fumaça foi removida via exaustão por 10 minutos e o procedimento repetido a cada período, totalizando 4 exposições diárias à fumaça de cigarro (WANG et al, 1999 e adaptado por PAIVA et al, 2005). Na primeira semana de exposição ao fumo, a fumaça foi obtida a partir de 5 cigarros, duas vezes por dia no período da tarde, com intervalos de descanso de 10 minutos, para adaptação do uso da máquina, como detalhes técnicos de manuseio e bombeamento da fumaça correto às câmaras.

O número de cigarros foi aumentado para o total de 10 cigarros/30 minutos, duas vezes no período da manhã e duas vezes no período da tarde. Durante o restante do período de estudo experimental, os animais foram expostos à fumaça de 40 cigarros/dia (ZORNOFF et al, 2006). O cigarro utilizado, apresentava a seguinte composição: 0,8 mg de nicotina; 10 mg de alcatrão; e 8 mg de monóxido de carbono.

### **3.3 Administração da empaglifosina**

Os comprimidos do medicamento foram diluídos em água, e adicionados na ração produzida na proporção de 10 mg/kg/dia de peso corporal, eram coletado o peso dos animais duas vezes na semana e acompanhados o ganho ponderal, o valor da média do peso corporal era a base para o cálculo da diluição dos comprimidos. A ração era produzida semanalmente, conforme (FRANCISQUETI et al, 2017), que foi ofertada aos animais que recebiam ou não a empaglifosina por cerca de 60 dias; com apenas o medicamento que estava em uma ração aos respectivos grupos Empa e Fumo Empa, e outros recebiam somente a ração produzida sem a empaglifosina. As variáveis dessa proporção constavam na média de peso corporal, consumo diário e dose por comprimido (CALADO & NUNES, 2015; TAHARA, A et al, 2016). O grupo Fumo, foi o escolhido para determinar a quantidade de ração ofertada a todos os animais, para garantir a mesma oferta calórica, e não haver diferenças no peso ou no consumo da medicação, ele foi escolhido para determinar a quantidade de ração ofertada, porque foi o

grupo que menos consumiu ração, por isso foi selecionado para manter o controle a quantidade consumida aos demais grupos de animais.

### 3.4 Pressão Arterial Sistólica

Após 60 dias de tratamento, na véspera da eutanásia, os mesmos foram submetidos à aferição da pressão arterial caudal por pletismografia. Os animais foram colocados em uma caixa de madeira forrada com maravalha, onde na tampa ficava acoplada uma lâmpada incandescente. A artéria caudal dilatava com o calor, logo após a dilatação, o animal era posto dentro de um tubo metálico específico, o animal e ficava apenas com a cauda de fora para aferição via aparelho da pressão arterial sistólica.

### 3.5 Avaliação funcional “in vivo”- Avaliação Doppler-ecocardiográfica

Os exames Doppler-ecocardiográficos foi realizado na última semana de biotério, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/Kg, i.p.) e cloridrato de xilazina (1mg/Kg, i.p.). Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em leve decúbito lateral esquerdo para a realização do exame. Foi utilizado o equipamento modelo Vivid S6 (*General Electric Medical Systems*, Israel), dotado de transdutor ultrassônico multifrequencial de 5,0-11,5 MHz. Para realizar as medidas estruturais do coração, as imagens foram obtidas em modo monodimensional (modo-M) orientado pelas imagens em modo bidimensional, com o transdutor em posição paraesternal, 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 curso do modo-M ao nível do plano da valva aórtica. As seguintes estruturas cardíacas foram medidas: diâmetro diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE; espessuras diastólicas da parede posterior do VE e do septo interventricular (EDPP e EDSIV); diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A espessura relativa do VE 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 pela porcentagem de encurtamento endocárdico (% $\Delta$  endo)  $[(DDVE - DSVE) / DDVE] \times 100$  e pela fração de ejeção (FE)  $[(DDVE^3 - DSVE^3) / DDVE^3] \times 100$ . A função diastólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: pico de velocidade do

enchimento diastólico inicial (onda E); pico de velocidade do enchimento diastólico tardio (onda A); razão entre as ondas E e A (E/A); tempo de desaceleração da onda E (TDE); tempo de relaxamento isovolumétrico em valores absolutos (TRIV) e normalizados pela frequência cardíaca ( $TRIV_n = TRIV/RR^{0.5}$ ).

### **3.6 Eutanásia dos animais**

Os animais foram submetidos a jejum de 12 horas antes da eutanásia, foram todos previamente anestesiados com tiopental sódico 150 mg/kg, intraperitoneal, e quando desacordados, logo em seguida foram decapitados. Coletados o soro sanguíneo e ventrículo esquerdo, o ventrículo esquerdo foi pesado, e ambos congelados em nitrogênio líquido e outras amostras foram separadas para histologia cardíaca em cassetes conservados em formol 10%. O método utilizado para a eutanásia foi a decapitação dos animais.

### **3.7 Análise histológica por hematoxilina**

Foi avaliada a área seccional do miócito do ventrículo esquerdo, fixado em formalina tamponada a 10% e embebidos em parafina. Seções de cinco microns de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). As medidas foram obtidas a partir de imagens digitalizadas (aumento de 400 ×) coletadas usando uma câmera de vídeo conectada ao microscópio Leica e software computadorizado de análise de imagens (Image-Pro Plus 3.0, Cibernética de mídia; Silver Spring, MD). As células selecionadas para análise foram cortados transversalmente com o núcleo claramente identificado no centro do miócito (RAFACHO et al, 2011).

### **3.8 Estudo histológico utilizando imunofluorescência**

Os corações de todos os animais tiveram a área seccional do miócito do VE seccionado a 4 mm, a partir do ápice, em fragmento de 3 mm de espessura, que foi fixado em solução de formol tamponado a 10% por período de 48 horas. Após fixação, o tecido foi incluso em blocos de parafina, obtendo-se, a seguir, cortes coronais para posterior análise histológica. Fragmentos do coração foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80° C para avaliação por imunofluorescência em parafina. O tecido foi fixado em lâmina “starfrost” ou em lâmina de vidro comum com silano. As lâminas foram aquecidas por 5 a 10 minutos, em estufa a 60°C. Em seguida lâminas foram colocadas em um bercinho

plástico e em imersão em Xylol (1) (5 min), Xylol (2) (5min), álcool 100% (1), álcool 100% (2), álcool 90% e álcool 70%. Depois, as lâminas foram imersas em ácido cítrico e aquecidas no microondas (3X de 1 minuto). Foram deixadas para esfriar por 20 minutos. O corte foi contornado com caneta própria (Super PAP Pen Liquid Blocker). Foram lavadas com água 1x e com PBS 2x de 2 min. Os cortes foram bloqueados com albumina 5% por 30 minutos e lavados com PBS. O anticorpo primário foi aplicado sobre os tecido e mantido até o dia seguinte. Foi utilizado anticorpo primário já fluorescente. Wheat germ agglutinin (WGA-FITC) Sigma L4895 – é fluorescente portanto não necessita de anticorpo secundário. Esta marcação foi utilizada para avaliação da área seccional dos miócitos. Foi aplicado meio Prolong gold antifade (P36934), foi coberta com lamínula e fixadas bordas com esmalte. Foi protegida da luz. As imagens foram adquiridas em objetiva 40X em microscópio de fluorescência Olympus serie BX acoplado a câmera de vídeo, que enviou imagens digitais a um computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram mensuradas 50 a 70 células por ventrículo analisado. Os miócitos selecionados foram seccionados transversalmente. As áreas seccionais médias obtidas para cada grupo foram utilizadas como indicador do tamanho celular.

### **3.9 Western Blot**

A expressão das proteínas Akt-total e Akt fosforilado e sirtuinas ,foram realizadas pela técnica Western Blot seguindo as seguintes etapas: extração tecidual de proteínas, eletroforese em gel, transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, identificação das proteínas por anticorpos específicos e quantificação das bandas por densitometria. A expressão dos peptídeos foi normalizada pela expressão da proteína constitucional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ou pela  $\beta$ -actina.

#### **3.9.1 Extração das proteínas miocárdicas**

Inicialmente os fragmentos amostrais (80-100 mg) foram homogeneizados com 1 mL de tampão de extração contendo NaCl 100 mM, TritonX-100 1% (v/v), desoxicolato de sódio 0,5% (w/v), SDS 0,1 % (w/v), glicerol 10% (v/v) Tris 10 mM (ph 7,4), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (P2714, Sigma- Aldrich). O homogenato foi centrifugado por 20 min, a 12000 rpm a 4° C, para eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi coletado e separado em alíquotas, que

foram armazenadas a  $-80^{\circ}$  C. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford utilizando a curva de BSA Protein Standard como padrão.

### 3.9.2 Eletroforese em gel

Após a quantificação da concentração proteica as amostras cardíacas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris - HCL 240mM, SDS 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e  $\beta$ -mercaptoetanol 200mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini -Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris - HCL 240mM pH 6,7, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de resolução (Tris - HCL 240mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed) a  $4^{\circ}$  C com 20  $\mu$ g de proteína total. A concentração do gel de empilhamento utilizada foi determinada de acordo com o peso molecular da proteína analisada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, *Kaleidoscope PrestainedStandards* (Bio Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi efetuada a 30 min a 50 V e 2:30 h a 120 V (Power Pac HC 3.0A, Bio - Rad, Hercules, CA, USA) com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

### 3.10 Transferência e identificação das proteínas

Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini - Trans Blot (Bio - Rad, Hercules, CA, USA), foi utilizado tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de 5% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído na solução basal, sob agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com o anticorpo secundário diluído em solução basal por 1:30 horas sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal pH 8,0. Por fim, a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA). As membranas de nitrocelulose foram

reveladas em um aparelho fotodocumentador ligado a um computador capaz de fotografar as membranas expostas ao reagente quimioluminescente, nos tempos padronizados para cada proteína estudada.

### **3.11 Anticorpos primários e secundários**

- PPAR $\alpha$  (H-98) 1:200 (SC-9000) 1:1000 Anti-mouse (SC-516102)
- Sirt-1 1:200 (SC-15404) 1:1000 Anti-rabbit (SC-2357)
- PGC-1 (4a8) 1:200 (SC-517380) 1:1000 Anti-rabbit (SC-2357)

### **3.12 Avaliação da resistência insulínica:**

Para o cálculo de resistência à insulina, foi utilizado o cálculo HOMA –IR : concentração de insulina ( $\mu$ U/ml) \* pela glicemia (mM/L)/22,5 de todos os animais (MATTHEWS et al, 1985).

### **3.13 Análise estatística**

Os dados foram expressos em média e desvio padrão, as comparações entre os grupos foram feitas pelo teste T de Student, par a par considerando (C x F); (F x FE); (C x E) e (E x FE) e utilizada a correção de Bonferroni, sendo os valores de “P” obtidos, multiplicados por 4 (quantidade de comparações). Diferença estatística com valor  $P < 0,05$ ; nível de significância adotado foi de 5%. O software utilizado foi o Sigma Stat.

#### 4 RESULTADOS

Conforme Tabela 1, não houve diferença nos pesos iniciais e finais, no ganho de peso, na ingestão alimentar e calórica, e na eficiência alimentar entre os grupos. O fato da ingestão alimentar estar com valores iguais, foi porque só foi considerada a média de ingestão apenas do grupo Fumo. A diferença observada foi na Eficiência Alimentar, entre os grupos C e E, apenas. Pela ausência de dados dos demais grupos, esse valor das gramas e ingestão calórica foi considerado para todos; pois o objetivo era controlar a ingestão para não haver diferenças estatísticas entre as médias de ingestão, consumo calórico, peso corporal e administração da empagliflosina.

Tabela 1- Perfil nutricional

Variáveis	Grupos				p valor			
	C (n=15)	E (n=15)	F (n=15)	FE (n=15)	C vs. F	F vs. FE	C vs. E	E vs. FE
Peso corporal inicial (g)	240±17	254±14	247±39	245±25	0,752	0,692	0,360	2,624
Peso corporal final (g)	361±19	353±10	371±38	356±27	2,456	0,444	0,648	0,892
Ganho de peso (g)	121±22	121±22	124±53	111±35	3,004	3,328	3,664	2,420
Ingestão alimentar (g)	21,2±1,7	21,2±1,7	21,2±1,7	21,2±1,7	1,404	1,404	1,404	1,404
Ingestão calórica (kcal)	76,2±6,2	76,2±6,2	76,2±6,2	76,2±6,2	4,000	4,000	4,000	4,000
Eficiência alimentar (%)	0,025±0,005	0,021±0,003 <sup>c</sup>	0,026±0,011	0,023±0,007	3,668	3,328	0,020	1,192

C: grupo controle; E: grupo empagliflosina; F: grupo fumo; FE: fumo + empagliflosina; HOMA-IR: (Homeostases Model Assesment). O perfil glicêmico foi realizado com 10 animais por grupo. Dados expressos em média ± desvio-padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes e complementada com teste de Bonferroni (Todos os valores de P estão multiplicados por quatro). Significância  $P < 0,05$ . Diferença entre grupo C vs. F<sup>a</sup>; F vs. FE<sup>b</sup>; C vs E<sup>c</sup>; E vs. FE<sup>d</sup>.

Na Tabela 2 Avaliamos o perfil glicêmico dos animais. Os resultados mostram que não houve diferença na glicemia e na insulina em nenhum dos grupos, com exceção do Índice HOMA-IR, que apresentou aumentado no grupo FE (8,64±3,32), apontando maior resistência à insulina, comparado com Grupo E (4,24±2,37). Comparando esse parâmetro entre o Grupo F e FE, houve um aumento numérico, mas não obteve diferença estatística; o que mostra que a empagliflosina não teve ação sobre a sensibilidade a insulina.

Tabela 2 - Perfil glicêmico

Variáveis	Grupos				p valor			
	C (n=10)	E (n=10)	F (n=10)	FE (n=10)	C vs. F	F vs. FE	C vs. E	E vs. FE
Glicemia (mg/dL)	113±19	122±22	122±11	117±10	0,916	1,312	3,832	1,984
Insulina (ng/ml)	0,30±0,18	0,45±0,26	0,64±0,40	0,78±0,32	0,176	1,560	0,612	0,084
HOMA-IR	3,45±2,42	4,24±2,37	7,77±4,85	8,64±3,32 <sup>d</sup>	0,100	2,568	1,676	0,012

C: grupo controle; E: grupo empagliflosina; F: grupo fumo; FE: fumo + empagliflosina; HOMA-IR: (Homeostases Model Assesment). O perfil glicêmico foi realizado com 10 animais por grupo. Dados expressos em média ± desvio-padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes e complementada com teste de Bonferroni (Todos os valores de P estão multiplicados por quatro). Significância P<0,05..

A Tabela 3, o grupo F também obteve maior pressão arterial que C, resultado da ação que o fumo leva devido aos mecanismos já mencionados na introdução; outro aumento da pressão arterial sistólica no grupo F e FE foi encontrado, mas o grupo FE obteve valor menor que o grupo F, apontando uma discreta ação da empagliflosina na redução da pressão arterial.

Tabela 3- Pressão arterial sistólica

Variáveis	Grupos				p valor			
	C (n=10)	E (n=10)	F (n=10)	FE (n=10)	C vs. F	F vs. FE	C vs. E	E vs. FE
Pressão Arterial (mmHg)	128±2	127±3	146±10 <sup>a</sup>	138±7 <sup>d</sup>	0,004	0,212	3,856	0,004

C: grupo controle; E: grupo empagliflosina; F: grupo fumo; FE: fumo + empagliflosina. Dados expressos em média ± desvio-padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes e complementada com teste de Bonferroni (Todos os valores de P estão multiplicados por quatro). Significância P<0,05. Diferença entre grupo C vs. F<sup>a</sup>; F vs. FE<sup>b</sup>; C vs E<sup>c</sup>; E vs. FE<sup>d</sup>.

Na Tabela 4 pelo ecocardiograma estrutural, podemos destacar redução dos valores do grupo FE, quando comparado ao grupo F, tais como a diminuição do DDVE, EDPP, EDSIV, AE, AE/PC, Massa VE, Esp. Rel. VE, area AE, volume AE e AE/AO; e aumento do AE/PC. Através dessas alterações, podemos afirmar que houve hipertrofia cardíaca concentrada nos animais, e a empagliflosina atenuou, por meio dos menores valores obtidos no ecocardiograma.

Tabela 4- análise estrutural por ecocardiograma

Variáveis	Grupos				p valor			
	C (n=15)	E (n=15)	F (n=15)	FE (n=15)	C vs. F	F vs. FE	C vs. E	E vs. FE
DDVE	6,96±0,36	6,98±0,32 <sup>a</sup>	6,46±0,45 <sup>a</sup>	6,61±0,29 <sup>d</sup>	0,012	0,412	3,328	0,008
DDVE/PC	0,019±0,001	0,020±0,001	0,018±0,002 <sup>a</sup>	0,019±0,002	0,032	0,380	1,348	0,132
DSVE	2,79±0,11	2,80±0,15	3,07±0,41 <sup>a</sup>	2,72±0,30 <sup>b</sup>	0,040	0,048	1,540	1,420
EDPP (mm)	1,48±0,05	1,48±0,05	1,76±0,09 <sup>a</sup>	1,49±0,04 <sup>b</sup>	0,004	0,004	3,020	2,588
EDSIV (mm)	1,51±0,03	1,52±0,02	1,90±0,12 <sup>a</sup>	1,54±0,09 <sup>b</sup>	0,004	0,004	0,628	1,768
AO (mm)	3,84±0,16	3,73±0,17	3,86±0,23	3,80±0,21	0,200	2,544	0,544	1,148

AE (mm)	4,55±0,18	4,57±0,16	5,25±0,20 <sup>a</sup>	4,66±0,10 <sup>b</sup>	0,004	0,004	2,484	0,224
AE/PC	0,013±0,001	0,013±0,001	0,014±0,001 <sup>a</sup>	0,013±0,001 <sup>b</sup>	0,004	0,032	0,672	1,768
Massa VE (g)	0,68±0,06	0,68±0,06	0,80±0,10 <sup>a</sup>	0,63±0,05 <sup>b</sup>	0,004	0,004	2,75	0,070
Índice MVE	1,83±0,20	1,94±0,18	2,10±0,33	1,80±0,16 <sup>b</sup>	0,052	0,020	0,51	0,150
Esp. Rel. VE	0,43±0,03	0,43±0,02 <sup>d</sup>	0,55±0,04 <sup>a</sup>	0,45±0,02 <sup>b</sup>	0,004	0,004	3,71	0,020
Área AE (mm)	15,7±1,1	16,4±1,2	22,5±2,5 <sup>a</sup>	16,4±0,6 <sup>b</sup>	0,004	0,004	0,52	2,65
Área AD (mm)	13±1,6	13,4±1,4	14±1,7	12,7±0,8	0,380	0,072	1,62	0,50
Volume AE	0,043±0,011	0,047±0,008	0,073±0,012 <sup>a</sup>	0,045±0,004 <sup>b</sup>	0,004	0,004	3,80	3,60
Volume AD	0,032±0,007	0,034±0,006	0,037±0,006	0,031±0,004 <sup>b</sup>	0,388	0,044	2,46	0,85
AE/AO	1,19±0,05	1,23±1,06	1,36±0,09 <sup>a</sup>	1,23±0,06 <sup>b</sup>	0,004	0,004	0,192	3,940

DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); DSVE: diâmetro diastólico do VE; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE. AO: aorta; AE: átrio esquerdo; Massa VE ; Índice MVE: índice de massa do VE; Esp Rel VE: espessura relativa do VE; Area AE: area do atrio esquerdo (AE); area AD: area do atrio direito (AD); volume AE: volume do AE; volume AD: volume do AD; AE/AO: razão entre AE e AO. Dados expressos em média ± desvio-padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes e complementada com teste de Bonferroni (Todos os valores de P estão multiplicados por quatro). Significância P<0,05. Diferença entre grupo C vs. F<sup>a</sup>; F vs. FE<sup>b</sup>; C vs E<sup>c</sup>; E vs. FE<sup>d</sup>.

A Tabela 5 mostra a análise da função sistólica, apresentando redução dos %Enc Endo e Força de Ejeção do grupo FE, o grupo F obteve valores menores, apontando disfunção sistólica. A empaglifosina também alterou o Vol VES, evitando o seu aumento. Através dos parâmetros, podemos observar o efeito atenuador do medicamento na função sistólica.

Encontrado também redução do IC, VS e DC do grupo F, e logo o grupo FE obtiveram valores maiores, sendo assim, a empaglifosina não reverteu o dano, apenas atenuou os efeitos da fumaça de cigarros, evitando maiores danos cardíacos. Outro ponto na comparação dos dados, é a falta de diferença quando comparado grupo F vs. FE, o medicamento amenizou os efeitos, porem o tratamento não foi capaz de preservar esses parâmetros da função sistólica.

Tabela 5- Analise da função sistolica por ecocardiograma

Variáveis	Grupos				p valor			
	C (n=15)	E (n=15)	F (n=15)	FE (n=15)	C vs. F	F vs. FE	C vs. E	E vs. FE
FC (bpm)	287±55	281±60	275±54	276±36	2,544	3,860	3,064	3,932
%Enc Endo	59,8±2,2	59,9±2,1	52,6±4,7 <sup>a</sup>	58,9±3,7 <sup>b</sup>	0,004	0,004	3,684	1,564
Fração ejeção	0,93±0,01	0,93±0,01	0,89±0,03 <sup>a</sup>	0,93±0,02 <sup>b</sup>	0,004	0,004	3,336	2,652
Vol VED (ml)	0,34±0,05	0,34±0,05	0,27±0,06 <sup>a</sup>	0,29±0,04 <sup>d</sup>	0,012	0,412	3,444	0,016
Vol VES (ml)	0,022±0,003	0,022±0,003	0,030±0,012 <sup>a</sup>	0,021±0,007 <sup>b</sup>	0,040	0,048	1,540	2,068
VS (ml)	0,317±0,053	0,320±0,044	0,243±0,053 <sup>a</sup>	0,269±0,035 <sup>d</sup>	0,004	0,060	3,476	0,008
DC (ml/min)	90±18	89±17	67±21 <sup>a</sup>	74±10 <sup>d</sup>	0,012	1,072	3,312	0,040
IC (ml/mmHg)	243±45	251±46	175±53 <sup>a</sup>	211±32 <sup>d</sup>	0,004	0,140	2,528	0,032

FC: Frequência Cardíaca; ENC ENDO: Encurtamento Endocárdico ; Vol VED : Volume do ventrículo direito; Vol VED : Volume do ventrículo esquerdo; VS: Volume sistólico; DC: Débito cardíaco; IC: Índice cardíaco. Dados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes e complementada com teste de Bonferroni (Todos os valores de P estão multiplicados por quatro). Significância  $P < 0,05$ . Diferença entre grupo C vs. F<sup>a</sup>; F vs. FE<sup>b</sup>; C vs E<sup>c</sup>; E vs. FE<sup>d</sup>.

Na Tabela 6 podemos ver que houve aumento do TRIV (ms) e TRIV R-R do grupo F, esse aumento do tempo de relaxamento é um indício de disfunção diastólica; em contraste, o grupo FE permaneceu com os valores normais, mostrando o efeito cardioprotetor da empagliflosina, que preservou os valores desse parâmetro no coração. Também com diferença entre alguns parâmetros do grupo E vs. FE, como aumento do E/A, A mitral e E mitral.

Tabela 6- Análise da função diastólica por ecocardiograma

Variáveis	Grupos				p valor			
	C (n=15)	E (n=15)	F (n=15)	FE (n=15)	C vs. F	F vs. FE	C vs. E	E vs. FE
Onda A (cm/s)	78,1 $\pm$ 8,8	81,6 $\pm$ 10,7	73,6 $\pm$ 6,9	74 $\pm$ 3,8	3,976	0,82	2,48	0,084
Onda E (cm/s)	45,3 $\pm$ 11,9	46,35 $\pm$ 8,6	46,07 $\pm$ 22,7	39,63 $\pm$ 3,9	2,724	3,516	3,34	0,16
E/A	1,70 $\pm$ 0,041	1,62 $\pm$ 0,25	1,87 $\pm$ 0,56	1,88 $\pm$ 0,21 <sup>d</sup>	2,136	2,136	3,604	0,016
TRIV R-R	49,1 $\pm$ 8,1	52 $\pm$ 4,3	64 $\pm$ 11,4 <sup>a</sup>	52,3 $\pm$ 6,4 <sup>b</sup>	0,004	0,008	0,920	3,564
TDE (ms)	46,8 $\pm$ 5,6	46,7 $\pm$ 2,9	51,9 $\pm$ 12,6	46,7 $\pm$ 3,6	1,356	0,980	2,172	4,000
TRIV (ms)	22,6 $\pm$ 3,3	24,3 $\pm$ 1,8	30,1 $\pm$ 5,3 <sup>a</sup>	24,5 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>	0,004	0,008	0,920	3,564
A mitral	48,5 $\pm$ 14	52,2 $\pm$ 14,4	42,8 $\pm$ 13,8	39,7 $\pm$ 4 <sup>d</sup>	1,232	2,408	1,952	0,012
E mitral	78,1 $\pm$ 8,8	81,6 $\pm$ 10,7	73,6 $\pm$ 6,9	74 $\pm$ 3,8 <sup>d</sup>	0,540	3,424	1,232	0,024

AE - diâmetro do átrio esquerdo; DDVE – diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE - diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; E/A - razão entre as ondas E e A do fluxo diastólico transmitral; TDE - tempo de desaceleração da onda ; AE - diâmetro do átrio esquerdo; DDVE - diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo. TRIV R-R : tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca. Os dados são expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. A distribuição dos dados para a comparação Teste “t” de Student para amostras independentes e complementada com teste de Bonferroni (Todos os valores de P estão multiplicados por quatro). Significância  $P < 0,05$ .. Diferença entre grupo C vs. F<sup>a</sup>; F vs. FE<sup>b</sup>; C vs E<sup>c</sup>; E vs. FE<sup>d</sup>.

A tabela 7 apresenta os dados da análise bioquímica, não houve diferença na maioria dos parâmetros, exceto com uma discreta redução dos níveis de sódio no grupo F. A empagliflosina não teve efeito sobre a retenção de sódio sobre a carga hemodinâmica. Sobre os triglicerídeos, não houve efeito lipotóxico sobre os triglicerídeos séricos dos animais, os valores são próximos entre os grupos, que pouco variaram suas médias. O que mostra que nem o fumo nem a empagliflosina tiveram ação sobre este parâmetro.

Em relação ao ácido úrico, os animais que foram expostos a fumaça apresentaram valores menores de ácido úrico no soro. Houve redução do grupo F, com relação ao grupo C.

O grupo FE foi o que apresentou o menor nível de ácido úrico, apontando a ação da empaglifosina em baixar os níveis de deste metabólito no organismo.

Tabela 7 – Dosagens bioquímica séricas dos animais expostos ou não à fumaça de cigarros e que receberam ou não a empaglifosina, em nenhum dos parametros foram encontradas diferenças entre os grupos, apontnado que o medicamento não teve ação sobre o fumo sobre os animais neste estudo.

Variáveis	Grupos				p valor			
	C (n=10)	E (n=10)	F (n=10)	FE (n=10)	C vs. F	F vs. FE	C vs. E	E vs. FE
Sódio (mmol/L)	147±4	146±4	142±3 <sup>a</sup>	142±5	0,016	3,984	2,296	0,184
Potássio (mmol/L)	5,04±0,69	5,08±0,87	4,94±0,63	4,64±0,59	0,184	1,152	1,972	0,736
Triglicerídeos (mg/dl)	287±55	281±60	275±54	276±36	0,864	0,372	2,808	1,176
Ácido Úrico (mg/dl)	0,90±0,30	0,65±0,48	0,47±0,05 <sup>a</sup>	0,42±0,15	0,008	0,72	1,204	0,960
LDL (mg/dl)	4,23±0,86	8,00±3,14	5,04±1,29	6,15±1,85	0,920	1,028	0,072	0,972

LDL- Lipoproteína de baixa densidade. Dados expressos em média ± desvio-padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes e complementada com teste de Bonferroni (Todos os valores de P estão multiplicados por quatro). Significância P<0,05. Diferença entre grupo C vs. F<sup>a</sup>; F vs. FE<sup>b</sup>; C vs E<sup>c</sup>; E vs. FE<sup>d</sup>.

Na Tabela 8 foram analisadas lâminas do ventrículo esquerdo, tanto por HE como IF, ambas metodologias não encontraram diferença na área média dos miócitos. As lâminas foram selecionados pelo orientador para leitura cega para não haver viés de leitura na hora da identificação dos grupos pelos examinadores, a escolha foi aleatória por sorteio dos animais, sendo heterogêneo o número de animais analisados por grupo.

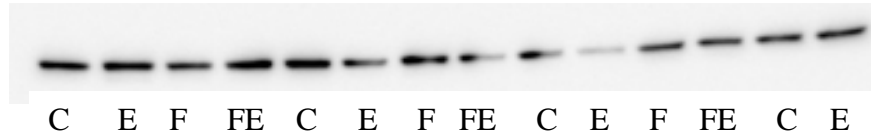
Tabela 8- Avaliação da área seccional do miócito

Variáveis (µm)	Grupos				p valor			
	C (n=7)	E (n=8)	F (n=6)	FE (n=7)	C vs. F	F vs. FE	C vs. E	E vs. FE
HE	243±62	301±26	265±55	314±24	2,08	0,29	0,22	1,35
IF	313±39	310±55	368±46	300±50	0,15	3,68	1,35	2,87

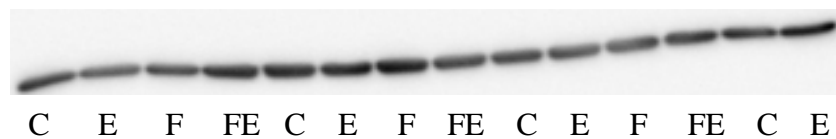
HE: Hematoxilina & Eosina ; IF: Imunofluorescência. Dados expressos em média ± desvio-padrão. Teste “t” de Student para amostras e complementada com teste de Bonferroni \*p<0,05.

A tabela 9 apresenta os dados do Western Blot, as respectivas bandas de expressão de proteínas, normalizadas pelo GADPH. Nota-se que não teve nenhuma diferença entre elas, mostrando que a empagliflosina e fumaça de cigarros não interferiram em suas expressões.

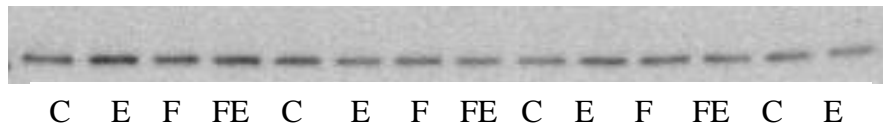
PGC1 $\alpha$



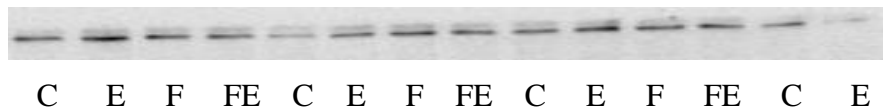
GADPH 8%



SIRT 1



PPAR $\alpha$



GADPH 10%

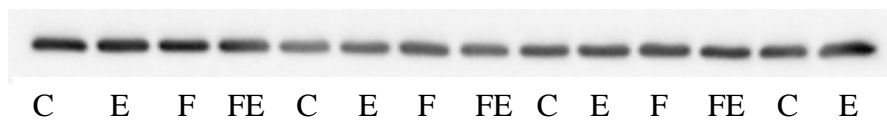


Tabela 9- Western Blot

	C	E	F	FE	C vs. F	F vs. FE	C vs. E	E vs. FE
SIRT 1	1,60±0,62	1,41±0,47	1,48±0,60	1,32±0,49	2,664	2,152	1,824	2,752
PCG1 $\alpha$	1,88±1,09	1,50±1,33	1,50±1,33	1,33±0,89	1,5	0,416	0,848	3,88
PPAR	2,39±1,23	2,77±1,64	2,77±1,64	3,15±2,47	2,468	3,640	2,252	2,492

SIRT 1: Sirtuinas; PCG $\alpha$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha PPAR: proliferador de peroxissoma Dados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. Teste "t" de Student para amostras independentes e complementada com teste de Bonferroni \*p<0,05. Diferença entre grupo C vs. F<sup>a</sup>; F vs. E<sup>b</sup>; C vs E<sup>c</sup>; E vs. FE<sup>d</sup>.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados desse trabalho mostraram-se relevantes, pois observou-se o efeito protetor da empagliflosina sobre o coração. A exposição à fumaça de cigarros induziu hipertrofia concêntrica, disfunção sistólica e diastólica, que foram atenuados pela empagliflosina. A pressão arterial, a resistência insulínica, expressão de proteínas do metabolismo de lipídeos, alterações de ácido úrico, ou sódio não foram vias que explicassem a participação da empagliflosina no coração e no organismo dos animais.

O modelo de exposição à fumaça de cigarros pode induzir diferentes tipos de hipertrofia e padrões de geometria. Foi observado por (AZEVEDO, 2010) que a presença de corações normais, com hipertrofia excêntrica e concêntrica em estudos que expuseram os animais à fumaça de cigarros. No presente estudo, fica clara a presença de hipertrofia concêntrica caracterizada por aumento do IMVE e da espessura relativa da parede, no grupo F. O grupo FE teve esses parâmetros atenuados. O modelo experimental de exposição ao fumo causa remodelação cardíaca semelhante ao que se observa na cardiomiopatia diabética. Portanto, o efeito da empagliflosina em atenuar hipertrofia no modelo do fumo pode ser oriundo de mecanismos semelhantes ao da cardiomiopatia diabética, que ainda não são conhecidos na literatura.

Em relação à função diastólica, observou-se também aumento do átrio esquerdo, que sugere disfunção diastólica do VE que está com a cavidade reduzida, e não comporta o volume de sangue. Além do AE, o TRIV mostra disfunção diastólica por retardo do relaxamento isovolumétrico. Estudo experimental com empagliflosina, mostrou efeito em normalizar os parâmetros, sobretudo o TRIV. (XUE, M et al, 2019).

Adicionalmente, no mesmo estudo, A razão (E / A) indicou que a função diastólica do ventrículo esquerdo estava marcadamente prejudicada em camundongos db / db; entretanto os grupos tratados com empagliflosina reverteram significativamente esses parâmetros da função diastólica. Não foram observadas diferenças significativas na frequência cardíaca entre os grupos de camundongos. Administração do medicamento melhorou a frequência diastólica e a sistólica cardíaca induzida por diabetes em camundongos db / db (XUE, M et al, 2019).

Em relação ao parâmetro da função sistólica, observa-se que a porcentagem de encurtamento endocárdico e fração de ejeção, estavam reduzidos nos animais do grupo expostos a fumaça de cigarros. Por sua vez, esse dano não foi encontrado nos animais que foram expostos a fumaça e receberam a empagliflosina, com aumento desses parâmetros; esses valores se assemelham com os demais grupos que não sofreram agressão cardíaca;

sendo mais um indicador da ação que o medicamento em atenuar os danos no órgão. Conforme Byrne, et al mostraram que a empaglifosina preservou a função sistólica em modelo animal de sobrecarga de pressão e não diabético (BYRNE, 2017).

Adicionalmente, em pacientes com insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida, a empaglifosina reduziu internação e mortalidade. (PARKER, 2020). Em estudo experimental, desenvolvido com camundongos db / db exibiram uma diminuição significativa nos parâmetros sistólicos do ventrículo esquerdo, incluindo fração de ejeção e da % de encurtamento em comparação com o grupo db / m; enquanto os camundongos tratados com empaglifosina mostraram uma melhora na fração de redução e força de ejeção. (XUE, M et al, 2019).

A empaglifosina reduziu o risco de morte cardiovascular ou hospitalização por em pacientes com Insuficiência Cardíaca e Fração de Ejeção reduzida. Essa é a conclusão do ensaio clínico reduzido em EMPEROR. O ensaio EMPEROR-Reduced foi desenhado para avaliar os efeitos da empaglifosina 10 mg uma vez ao dia (em comparação com placebo) em pacientes com os parâmetros acima reduzidos, com ou sem diabetes, que já estavam recebendo todos os tratamentos apropriados para Insuficiência Cardíaca. Por sua vez, a empaglifosina reduziu o risco de eventos graves de insuficiência cardíaca em 30% e diminuiu o risco de resultados renais adversos graves em 50%. (PACKER, M, 2019).

Sobre os potenciais mecanismos que possam estar envolvidos nos efeitos benéficos da empaglifosina na remodelação induzida pela exposição à fumaça de cigarros, investigamos pressão arterial e alterações eletrolíticas, resistência insulínica, expressão de proteínas do metabolismo energético, marcadores de metabolismo de gordura e ácido úrico.

O efeito hemodinâmico parece ser o mecanismo de ação mais consensualmente apontado como responsável pelo benefício cardiovascular precoce da empaglifosina, pela redução na pressão arterial e do volume intravascular e indução de diurese osmótica (MONTEIRO, P et al, 2019).

O fumo pode causar um aumento agudo da pressão arterial e da frequência cardíaca, provavelmente mediada pela nicotina que age como um agonista adrenérgico, promovendo a liberação local e sistêmica de catecolaminas (SOUZA, 2015). No presente estudo, o grupo F teve o maior valor de pressão, corroborando com a literatura; e por sua vez, o grupo FE foi maior que o grupo E, apontando que a exposição a fumaça aumentou os valores pressóricos dos animais expostos de ambos os grupos a fumaça de cigarros.

Entretanto, a PA dos grupos F e FE foram semelhantes, o que sugere que os efeitos observados no presente estudo não foram pela via de controle pressórico.

Estudo prévio evidenciou que o tratamento crônico com os inibidores de SGLT2 foram associados a uma pequena redução da pressão (3-4 mmHg de pressão arterial média) também confirmado por monitoramento de pressão arterial de 24 horas (LAMBERS, 2013 apud NATALI, A. 2017).

Em relação ao ácido úrico, este é produto do metabolismo das purinas, que quando seus níveis estão aumentados, se relaciona com doenças, como cardiovascular e renal. A nível endotelial, o ácido úrico diminuiria os níveis de óxido nítrico e aumento das espécies reativas de oxigênio, promovendo inflamação vascular e proliferação de células de músculo liso. Fatores de risco, como obesidade e síndrome metabólica associam-se à hiperuricemia, e às manifestações da doença cardiovascular, como doença arterial periférica e coronariana (CEBOLLADA&GIMENO, 2012) No presente estudo, não observamos mudanças nas concentrações de ácido úrico na presença da empagliflosina. Entretanto, há estudos prévios que mostraram efeitos da empagliflosina sobre esse parâmetro. (SANTOS, L, 2017). Por exemplo, a empagliflosina reduziu os níveis de ácido úrico no plasma em comparação com placebo, esta observação apoia a análise de mediação realizada em EMPAREG OUTCOME, demonstrando que as alterações no ácido úrico da redução na mortalidade pro causa cardiovascular e falha cardíaca (VERMA S et al, 2019).

Sobre os aspectos metabólicos: perfil lipídico, resistência insulínica e metabolismo energético, o presente estudo não evidenciou alterações no índice de HOMA, triglicerídeos sérico, expressão de proteínas como o peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR- $\alpha$ ), o peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PGC-1  $\alpha$ ) e sirtuína (SIRT-1).

Os triglicerídeos são formados por 3 ácidos graxos ligados ao glicerol. Os TG captados pelo coração são oxidados formando acetil-coenzima que entram no ciclo de Krebs, como substrato para transformação de energia. O medicamento não apresentou alteração significativa sobre os níveis séricos de triglicerídeos, o que não aconteceu com trabalhos encontrados na literatura. Em estudo com empagliflosina, os níveis de colesterol total e os triglicerídeos diminuíram significativamente no grupo que utilizou o medicamento, os pacientes receberam 10 mg diariamente, e embora houvesse a redução não apresentou diferença entre os grupos. (SCHIN, Y, 2020). Outro estudo também diz que pacientes com diabetes tipo 2 que receberam 10 mg de empagliflosina por 12 meses; que por sua vez, os

níveis de LDL-colesterol, HDL-colesterol e triglicerídeos permaneceram inalterados; aumentaram significativamente e diminuíram, respectivamente. Não foram encontradas diferenças com significância estatística em comparação com o placebo (HATTORI, S, 2018).

Outro trabalho, também aponta que não houve diferença entre os grupos, quando comparados os níveis de colesterol e triglicerídeos; no entanto houve aumento significativo em ambos os parâmetros, quando comparados com os controles; o que aponta o não efeito da empagliflosina sobre baixar esses parâmetros em ratos que também receberam a mesma quantidade de medicamento na dose de 10 mg/kg/dia (ANDREADOU, I et al 2017).

O LDL-colesterol (lipoproteína de baixa densidade) é outro parametro de lipotoxicidade, e em nosso estudo não encontramos diferença em nenhum dos grupos analisados, a empagliflosina protegeu o coração, no entanto não apresentou melhora significativa nos animais sobre a lipotoxicidade causada pelo fumo. Na literatura buscada não há um consenso, havendo concordancia com os dados encontrados de não haver diferença, na maioria dos estudos experimentais analisados comparando nosso resultado, mostrando que o edicamento não é eficaz sobre a redução dos níveis de LDL.

De acordo com a literatura, alguns trabalhos se apresentam controversos com relação a função da empagliglosina sobre o LDL, por exemplo (LANGSLET,G et al, 2020) cita que análise mostra que os efeitos benéficos moduladores de empagliflosina nos resultados cardiovasculares não diferiram entre as categorias dos níveis basais de LDL. Outro estudo com ratos que receberam por 12 semanas, a empagliflosina na dosagem de 10 mg/kg/peso, como o presente estudo; os resultados mostraram que ela pode reduzir os níveis de LDL-C entre os dois grupos estudados (LIU Y, 2021); diferente do nosso resultado.

A metabolização dos ácidos graxos é estimulada pelo PPAR- $\alpha$ / PGC-1  $\alpha$ . A SIRT-1 estimula o PGC1-  $\alpha$ . No processo de remodelação cardíaca associado à resistência insulínica, existe maior captação de ácidos graxos pelos miócitos, excedendo a capacidade de oxidação e com isso ocorre a deposição de lipídeos nos miócitos, em forma de TG e ceramidas, levando à lipotoxicidade. (AZEVEDO et al, 2013).

A literatura traz possíveis mecanismos; como perda de glicose pela diminuição da reabsorção renal, os efeitos da empagliflosina parecem induzir uma alteração metabólica com produção de um sistema energeticamente mais eficiente por meio da mudança de consumo de glicose e ácidos graxos para um sistema que utiliza corpos cetônicos, otimizando o desempenho cardíaco e renal (MONTEIRO, P et al, 2019; MUDALIAR et. al, 2016). Os corpos cetônicos são quase exclusivamente sintetizados no fígado quando há altas

concentrações de ácidos graxos na circulação e, quando a produção de acetil-coenzima A excedem os requisitos hepáticos. Estes metabólitos na circulação são captados por tecidos extra hepáticos, especialmente o coração e o rim e cérebro. (MUDALIAR et. al, 2016). A participação dos corpos cetônicos nesse processo não foi avaliada no presente estudo.

Embora nosso trabalho não apresentou diferença nos índices glicêmicos e sensibilidade a insulina, estudo prévio aponta melhora no controle da glicemia, resistência à insulina e triglicérides em pacientes diabéticos, com a dosagem de empagliflosina 10 mg diária ofertada por seis meses (SAWADA, T et al, 2020).

A respeito da expressão das proteínas do Western Blot, foram avaliadas algumas proteínas, dentre elas, encontramos na literatura que; um dos moduladores mais importantes do uso de substratos energéticos do coração é o receptor ativador do proliferador de peroxissoma (PPAR). Em condições normais, PGC-1 $\alpha$  ativa fatores respiratórios nucleares que estimulam o PPAR $\alpha$  (AZEVEDO, 2013).

Uma breve explicação, a fim de entender melhor o que cada proteína significa no metabolismo energético, segundo (ADITYA, et al, 2017) as SIRT1 (sirtuínas) são enzimas que agem através de PGC-1 $\alpha$  (coativador de receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma) para ativar a transcrição PPAR $\alpha$  (receptor ativado por proliferador de peroxissoma) para induzir genes catabólicos de ácidos graxos.

Por exemplo, durante a privação de nutrientes, a ativação de SIRT1 causa a metabolização de ácidos graxos no coração. A SIRT1 age através de PGC-1 $\alpha$  para ativar a transcrição PPAR $\alpha$  para induzir genes para oxidação de ácidos graxos por meio da  $\beta$  oxidação, como fonte de energia (ADITYA, et al, 2017).

Além disso, a interação de PGC-1 $\alpha$  com fatores de transcrição PPAR $\alpha$  e ERR $\alpha$  resulta na indução de genes de oxidação de ácidos graxos, como CPT-1b (carnitina palmitoiltransferase) e MCAD (Malonil-CoA descarboxilase). A SIRT1 ativa PPAR $\alpha$  através da desacetilação de PGC-1 $\alpha$  para induzir a transcrição de genes para metabolização de ácidos graxos no coração durante privação nutricional. Além da SIRT1 também estar envolvida no aumento da sensibilidade à insulina e ativação da  $\beta$ -oxidação através da indução de PGC-1 $\alpha$ . (ADITYA, et al, 2017). Dessa forma, fizemos a hipótese de que a empagliflosina pudesse modular a expressão dessas proteínas, que poderiam melhorar a sensibilidade à insulina e a metabolização de ácidos graxos no coração. Entretanto, não houve diferenças na quantificação dessas proteínas entre os grupos estudados.

## 6 CONCLUSÃO

O protocolo de fumo foi efetivo na indução de danos cardíacos observado por hipertrofia concêntrica e disfunções diastólica e sistólica. A empagliflosina teve seu efeito cardioprotetor em diversos parâmetros cardíacos, mantendo em estrutura e função dos animais que foram submetidos a exposição do fumo. As vias metabólicas avaliadas ácido úrico, resistência insulínica, lipídios séricos e expressão de PPAR- $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$  e SIRT-1 não participaram desse processo.

## 7 REFERENCIAS

- ABEL ED, DOENST, T. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. **Cardiovascular Research**, v. 1;90(2), p. 234-242. 2011.
- ADITYA R., et al. A Review on Sirttuins in Diabetes. **Current harmaceutical Design**,v. 23, p. 2299-2307. 2017.
- ANDREADOU, I, ET AL. Empagliflozin Limits Myocardial Infarction in Vivo and Cell Death in Vitro: Role of STAT3, Mitochondria, and Redox Aspects. **Frontier in Physiology**, p. 1-14, 19. 2017.
- ANSARY TM, et al. Responses of renal hemodynamics and tubular functions to acute sodium–glucose cotransporter 2 inhibitor administration in nondiabetic anesthetized rats. **Nature**, v. 7: 9555. 2017.
- AZEVEDO PS, et al. Remodeling pattern and ventricular function in rats exposed to cigarette smoke. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.94, n.2, p.224-228. 2010.
- AZEVEDO PS. The role of glucose metabolism and insulin resistance in cardiac remodelling induced by cigarette smoke exposure. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 25, p. 1314–1318. 2021.
- BENETTI, E ET AL. Empagliflozin Protects against Diet-Induced NLRP-3 Inflammasome Activation and Lipid Accumulation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.359 (1), p.45-53. 2016.
- BUTLER. J et al. The potential role and rationale for treatment of heart failure with sodium–glucose co-transporter 2 inhibitors. **European Journal of Heart Failure**, Novembro; v.19 (11), p. 1390-1400. 2017.
- CALADO J; NUNES, SILVA J. Empagliflozina: Uma Nova Arma Farmacológica na Terapêutica da Diabetes Tipo 2. **Revista Portuguesa de Diabetes**, v. 10 (3): 118-126. 2015.
- BYRNE J N ET AL. Empagliflozin Prevents Worsening of Cardiac Function in an Experimental Model of Pressure Overload-Induced Heart Failure. **JACC: Basic to Translational Science**, v. 2 , n. 4 , agosto: 347 – 354. 2017.
- CEBOLLADA, J; GIMENO, J.A. Ácido úrico como factor de riesgo cardiovascular. **Hipertensión y Riesgo Vascular**, v. 29, Issue 2, Abril–Junho, p. 36-43. 2012.
- FRANCISQUETI, F.V. et al. Effect of Gamma-Oryzanol as Therapeutic Agent to Prevent Cardiorenal Metabolic Syndrome in Animals submitted to High Sugar-Fat Diet. **Nutrients**; vol. 9 (12), 1299. 2017.

GVOZDJÁKOVÁ A, BADA V, SÁNY L, KUCHARSKÁ J, KRUTÝ F, BOZEK P. Smoke cardiomyopathy: disturbance of oxidative processes in myocardial mitochondria. **Cardiovascular Research**; vol. 18(4):229-32. 1984.

HATTORI, S. Anti-inflammatory effects of empagliflozin in patients with type 2 diabetes and insulin resistance. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, 10:93, p. 1-7.2018.

KAPLAN A, ABIDI E, GHALI R, BOOZ GW, KOBEISSY F, ZOUEIN FA. Functional, Cellular, and Molecular Remodeling of the Heart under Influence of Oxidative Cigarette Tobacco Smoke. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**.; p.1-16. 2017.

LIU, Y; XU, J; WU M; XU BIAO; KANG, L. Empagliflozin protects against atherosclerosis progression by modulating lipid profiles and sympathetic activity. **Lipids in Health and Disease**; v. 20:5, p. 1-9. 2021.

MINICUCCI M, et al. Pentoxifylline Attenuates Cardiac Remodeling Induced by Tobacco Smoke Exposure. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 106(5), p. 396–403. 2016.

MINICUCCI, MF et al. Relevância do Padrão de Remodelamento Ventricular no Modelo de Infarto do Miocárdio em Ratos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**; v. 95(5), p.635-639. 2010.

MINZE MG, et al. Benefits of SGLT2 Inhibitors Beyond Glycemic Control – A Focus on Metabolic, Cardiovascular, and Renal Outcomes. **Current Diabetes Reviews**; v. 14, Issue 6, p. 509-517. 2018.

MONTEIRO, P et al. Efeito da empaglifosina para além do controlo glicémico: benefício cardiovascular em doentes com DMT2 e doença cardiovascular estabelecida. **Revista Portuguesa de Cardiologia**; v. 38, 10, Outubro, 721-735. 2019.

MUDALLIAR,S; ALLOJU S, HENRY, R. Can a Shift in Fuel Energetics Explain the Beneficial Cardiorenal Outcomes in the EMPA-REG OUTCOME Study? A Unifying Hypothesis. **Diabetes Care** , v. 39, p.1115–1122. 2016.

NATALI, A, et al. Impact of empaglifozin on subclinical left ventricular dysfunctions and on the mechanisms involved in myocardial disease progression in type 2 diabetes: rationale and design of the EMPA-HEART trial. **Cardiovascular Diabetology**, v.16:130, p. 1-12. 2017.

OPAS BRASIL, Folha informativa – Tabaco. **PAHO.org** . Disponível em <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5641:folha-informativa-tabaco&Itemid=1097](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5641:folha-informativa-tabaco&Itemid=1097)> . Acessado em 11 de julho de 2020.

PACKER, M. ET AL. Evaluation of the effect of sodium–glucose co-transporter 2 inhibition with empagliflozin on morbidity and mortality of patients with chronic heart failure and a reduced ejection fraction: rationale for and design of the EMPEROR-Reduced trial. **European Journal of Heart Failure**, v. 21, p. 1270–1278. 2019

PAIVA SA, et al. Beta-carotene attenuates the paradoxical effect of tobacco smoke on the mortality of rats after experimental myocardial infarction. **The Journal of Nutrition**. V.135, 9, p. 2109–2113.2005.

PIRES, V. C. M. Influência da metformina no metabolismo energético cardíaco de ratos expostos à fumaça de cigarros, 2018. **repositorio.unesp.br**. Disponível em < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/153891>>. 2018. Acessado em 14 de julho de 2020

SANTOS, LL; LIMA. J C.; RODRIGUES, CFS; BARBOSA, FT. Uso dos inibidores da SGLT-2 no tratamento do diabetes mellitus tipo 2. **Revista da Associação Médica Brasileira**. V.63 n.7 São Paulo. 2017.

SAWADA, T ET AL. Empagliflozin's Ameliorating Effect on Plasma Triglycerides: Association with Endothelial Function Recovery in Diabetic Patients with Coronary Artery Disease. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**. 27(7), p. 644–656, 2020.

SCHIN, Y, et al. Glycemic Efficacy and Metabolic Consequences of an Empagliflozin Add-on versus Conventional Dose-Increasing Strategy in Patients with Type 2 Diabetes Inadequately Controlled by Metformin and Sulfonylurea. **Endocrinology and Metabolism** . V.35, p. 329-338, 2020.

SPIGONI, V. ET AL. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors antagonize lipotoxicity in human myeloid angiogenic cells and ADP-dependent activation in human platelets: potential relevance to prevention of cardiovascular events. **Cardiovascular Diabetology**. V.19:46, p. 1-15, 2020.

SOUZA, M.G. Tabagismo e Hipertensão arterial: como o tabaco eleva a pressão. **Revista Brasileira de Hipertensão**. V. 22(3), p.78-83, 2015

TAHARA, A; et al. Characterization and comparison of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacologic effects. **Journal of Pharmacological Sciences**. V.130 (3), P. 159-169 ,2016.

VERMA, S ET AL. Association between uric acid levels and cardio-renal outcomes and death in patients with type 2 diabetes: A subanalysis of EMPA-REG OUTCOME. **Diabetes Obesity Metabolic**. V. 22, p. 1207–1214, 2020.

WANG X-D, LIU C, BRONSON RT, et al. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposure to tobacco smoke. **Journal of the National Cancer Institute**. V.91 (1), P.60–66, 1999.

WITTELES RM, FOWLER MB. Insulin-resistant cardiomyopathy clinical evidence, mechanisms, and treatment options. **Journal of the American College of Cardiology**. V.51 (2), P.93-102, 2008.

XUE M ET AL. Empagliflozin prevents cardiomyopathy via sGC-cGMP-PKG pathway in type 2 diabetes mice. **Clinical Science**. V. 133. P. 1707–1708, 2019.

YE Y, et al. SGLT-2 Inhibition with Dapagliflozin Reduces the Activation of the Nlrp3/ASC Inflammasome and Attenuates the Development of Diabetic Cardiomyopathy in Mice with Type 2 Diabetes. Further Augmentation of the Effects with Saxagliptin, a DPP4 Inhibitor. *Cardiovasc Drugs Ther*. **Cardiovascular Drugs and Therapy**. V. 31 (2), p.119–132, 2017.

ZHOU X, ZHAO L, MAO J, HUANG J, CHEN J. Antioxidant effects of hydrogen sulfide on left ventricular remodeling in smoking rats are mediated via PI3K/Akt-dependent activation of Nrf2. **Toxicological Sciences**. V. 144 (1), p. 197–203, 2015.

ZORNOFF, L. A. M.; et al. A exposição à fumaça de cigarro intensifica a remodelação ventricular após o infarto agudo do miocárdio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. V.86 n.4, São Paulo, 2006.