



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

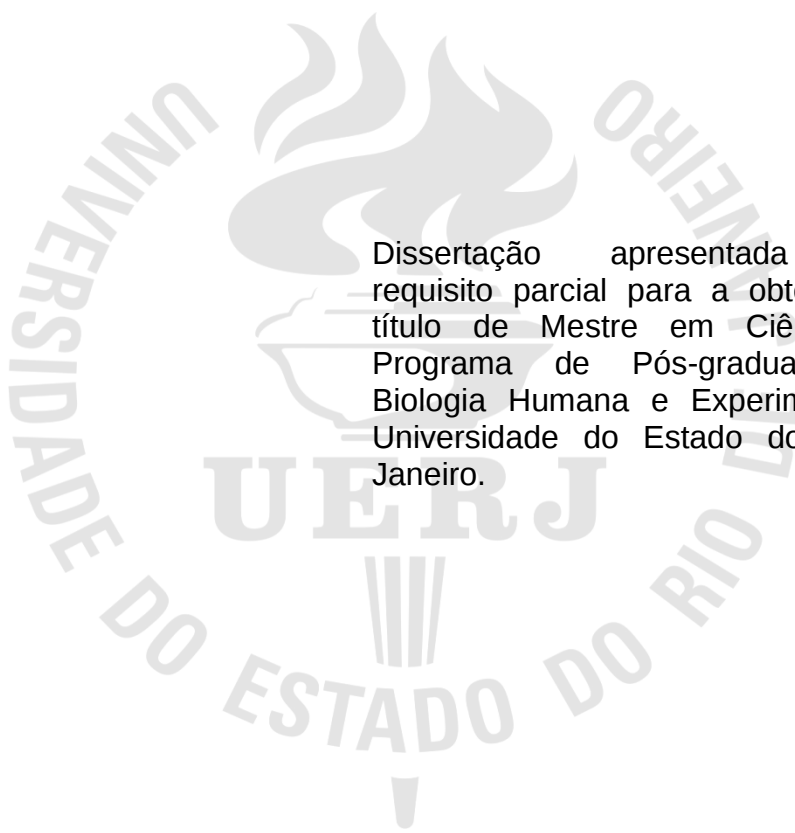
Juliana Cordovil Cotrin

**Efeitos cardiometabólicos do inibidor SGLT2, Empagliflozina, em
modelo experimental de camundongos C57Bl/6 induzido por
dieta hiperlipídica**

Rio de Janeiro
2020

Juliana Cordovil Cotrin

Efeitos cardiometabólicos do inibidor SGLT2, Empagliflozina, em modelo experimental de camundongos C57Bl/6 induzido por dieta hiperlipídica



Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Sandra Barbosa da Silva

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

C845 Cotrin, Juliana Cordovil.

Efeitos cardiometabólicos do inibidor SGLT2, Empagliflozina, em modelo experimental de camundongos C57BL/6 induzido por dieta hiperlipídica / Juliana Cordovil Cotrin – 2020.
102 f.

Orientadora: Sandra Barbosa da Silva

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Doenças cardiovasculares – Teses. 2. Sistema renina-angiotensina – Teses 3. Estresse do Retículo Endoplasmático. 4. Gorduras na dieta – Teses. 5. Dieta Hiperlipídica. I. Silva, Sandra Barbosa da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.12

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Juliana Cordovil Cotrin

Efeitos cardiometabólicos do inibidor SGLT2, Empagliflozina, em modelo experimental de camundongos C57Bl/6 induzido por dieta hiperlipídica

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 06 de agosto de 2020.

Banca examinadora: _____

Prof.^a Dra. Sandra Barbosa da Silva (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Daniel Arthur Barata Kasal
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Anissa Daliry
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro
2020

DEDICATÓRIA

Dedico à mulher que me ensinou a amar: Maria José.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora por ter me aceitado e me ajudado a construir esse trabalho mesmo em meio à tanta crise. Junto com ela preciso agradecer à Tamiris Ingrid por ter me doado seus animais e esse projeto, por ter me ensinado cada passo e ter compreendido minhas crises. Sem vocês duas não sei como esse projeto seguiria.

Aproveitando, eu gostaria de agradecer a cada professor que passou pela minha vida e cada ensinamento que trago deles. Com certeza, tenho um pouco de todos. Com certeza, aprendi com os melhores.

Aos meus pais por terem me dado tantas oportunidades. Por desde o início me apoiarem e incentivarem a sempre correr atrás dos meus sonhos e sempre dar o melhor de mim. Em especial, à minha irmã, que sem dúvidas, é minha maior fã.

À minha vó Maria. Não pude te fazer viver “para sempre”, nem até os 100 anos. Mas você chegou bem perto disso. Você estará sempre dentro de mim e dentro de cada um que você acolheu e amou. Obrigada por me ensinar a amar e a entender, hoje, o que significa viver “para sempre”. Espero que um dia eu seja metade do que você foi.

Aos meus amigos. Aos de infância: obrigada por entenderem minha ausência, mas também por sempre terem estado presentes. Obrigada por cada vez que vocês me fizeram ir “mais devagar” e “desacelerar”. Aos do LMMC: obrigada por me ajudarem a não surtar, pelos sorrisos do dia a dia, pelos lanchinhos e puxões de orelha.

Por último, mas não menos importante, ao meu namorado. Victinho, obrigada por ter aparecido na minha vida no meio desse caos chamado mestrado e ter feito meus dias tão tão mais leves e felizes. Obrigada por sempre acreditar em mim e me lembrar o quanto eu sou capaz e sou incrível. Obrigada por me ouvir ensaiar mil vezes e pelas perguntas científicas inesperadas do dia a dia, espero um dia ser capaz de responder todas (risos).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Mesmo quando a gente não sabe exatamente o que dizer para falar o tamanho do amor que a gente sente, a gente sempre encontra uma forma. Às vezes até com palavras muito simples.

Roberto Carlos

RESUMO

COTRIN, Juliana Cordovil. *Efeitos cardiometabólicos do inibidor SGLT2, Empagliflozina, em modelo experimental de camundongos C57BL/6 induzido por dieta hiperlipídica*. 2020. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Os benefícios cardiometabólicos da empagliflozina são multidimensionais e alguns mecanismos ainda não foram elucidados. Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito do tratamento com empagliflozina em parâmetros biométricos e expressão gênica no SRA local cardíaco, vias do estresse oxidativo e do retículo endoplasmático (ERE). 40 camundongos C57BL/6 machos foram alimentados com uma dieta controle (C) ou *high-fat* (HF) durante 10 semanas. Após esse período esses grupos foram subdivididos (C, CE, HF, HFE) para receber o tratamento com empagliflozina (10mg/kg/dia) por 5 semanas. Foram realizadas análises bioquímicas, monitoramento da pressão arterial (PA), teste oral de tolerância a glicose, estereologia do ventrículo esquerdo (VE), morfometria da área dos cardiomiócitos (A[car]) e RTq-PCR para genes relacionados ao estresse oxidativo e ERE no VE, assim como relacionados à via clássica e contra-regulatória do SRA local do VE. Comparando os grupos HF e HFE, o tratamento com empagliflozina reduziu a massa corporal (-7%), intolerância a glicose (-5%) e resistência a insulina (-62%), colesterol plasmático total (-19%), ácido úrico plasmático (-17%) e PA (-15%). Também reduziu a espessura do VE (-15%) e a A[car] (-27%), além de diminuir a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e ERE no VE. O SRA local cardíaco apresentou menor ativação da sua via clássica e efeitos positivos sobre a via contra-regulatória. Nossos resultados sugerem que a empagliflozina exerceu um efeito cardiometabólico benéfico através de mecanismos que podem ser estar relacionados à regulação da via SRA corroborando para a redução dos fatores de risco das doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: Empagliflozina. Sistema renina angiotensina. Estresse do retículo. Dieta hiperlipídica.

ABSTRACT

COTRIN, Juliana Cordovil. *Cardiometabolic effects of the SGLT2 inhibitor, Empagliflozin, in an experimental model of C57BL/6 mice induced by a high-fat diet*. 2020. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

The cardiometabolic benefits of empagliflozin are multidimensional and the mechanisms have not been elucidated. Thus, the aim of the present study is to evaluate the effect of treatment with empagliflozin on biometric parameters and gene expression in the local cardiac Renin Angiotensin System (RAS), oxidative stress and endoplasmic reticulum (ERS) pathways. Forty male C57BL/6 mice were fed with a control or high fat (HF) diets for 10 weeks. After this period, the groups were subdivided (C, CE, HF, HFE) and empagliflozin (10mg/kg/day) was administered for 5 weeks. We performed biochemical analyzes, blood pressure (BP) monitoring, oral glucose tolerance test, left ventricle (LV) stereology, cardiomyocytes area (A[car]) morphometry and RT-qPCR for genes related to oxidative stress and ERS in LV, as related to classical and counter-regulatory local LV RAS. Comparing HF and HFE groups, the treatment with empagliflozin reduced body mass (-7%), glucose intolerance (-5%) and insulin resistance (-62%), total plasma cholesterol (-19%), plasma uric acid (-17%) and BP (-15%). Also reduced LV thickness (-15%) and A[car] (-27%), besides decreasing oxidative stress and ERS related genes in LV. The local LV RAS had less activity of the classical pathway and positive effects on counter-regulatory pathway. Our analysis suggests that empagliflozin exerts beneficial cardiometabolic effects beneficial through mechanisms that may be related to the regulation of the RAS pathway corroborating for the reduction of risk factors for cardiovascular diseases.

Keywords: Empagliflozin. Renin angiotensin pathway. Endoplasmic reticulum. High-fat diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Evolução da placa aterosclerótica.....	22
Figura 2 –	Hipertrofia do ventrículo esquerdo.....	23
Figura 3 –	Via do Sistema Renina Angiotensina.....	27
Figura 4 –	Principais efeitos do Sistema Renina Angiotensina no coração.....	32
Figura 5 –	Via do Estresse do retículo endoplasmático.....	35
Figura 6 –	Mecanismo de absorção da glicose e ação dos inibidores do SGLT2.....	37
Figura 7 –	Área teste com a grade de 36 pontos.....	48
Figura 8 –	Evolução na massa corporal.....	53
Figura 9 –	Volume urinário e glicose urinária.....	55
Figura 10 –	Teste Oral de Tolerância a Glicose (pré e pós tratamento).....	57
Figura 11 –	Glicemia de jejum, Insulina plasmática e HOMA-IR.....	59
Figura 12 –	Evolução da Pressão Arterial Sistólica.....	60
Figura 13 –	Espessura da parede do ventrículo esquerdo e Área Seccional média dos cardiomiócitos (A[car])	65
Figura 14 –	PCR do Sistema Renina Angiotensina local no coração.....	68
Figura 15 –	PCR do estresse do retículo endoplasmático no coração.....	69
Figura 16 –	PCR do estresse oxidativo no coração.....	71
Figura 17 –	Expressão de <i>Plin2</i> no coração.....	72
Figura 18 –	Resumo gráfico.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição das dietas.....	43
Tabela 2 –	Primers utilizados nas análises de RT-qPCR.....	50
Tabela 3 –	Ingestão alimentar e hídrica.....	54
Tabela 4 –	Resultados referentes a bioquímica plasmática.....	62
Tabela 5 –	Resultados de massa e hidroxiprolina no coração.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGS	Ácido Graxo Saturado
AGT	Ácido Graxo Trans
AHA	<i>American Heart Association</i>
AKT	Proteína cinase B
Ang	Angiotensina
AT1	Receptor de Angiotensina do tipo 1
AT2	Receptor de Angiotensina do tipo 2
ATF	<i>Activating transcription factor</i>
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
Bip	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
CHOP	<i>C/EBP Homologous Protein</i>
CMD	Cardiomiopatia Diabética
DCV	Doença Cardiovascular
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ERE	Estresse do Retículo Endoplasmático
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GADD45	<i>Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45</i>
GLUT	Transportador de Glicose
GRP-78	<i>Glucose-regulated protein-78</i>
HC	Hipertrofia cardíaca
HF	<i>High Fat</i>
HME	<i>The Institute for Health Metrics and Evaluation</i>
IM	Infarto do Miocárdio
IL-6	Interleucina-6
IRE-1	<i>Inositol requiring enzyme 1</i>
LDL	Lipoproteína de baixa intensidade
MEC	Matriz Extracelular
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>

MMP	Metaloproteínas
MUFA	Ácido Graxo mono-insaturado
NHE3	Trocador de Sódio e Hidrogênio
NOX	NADPH oxidase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão Arterial
PERK	<i>PKR-like eukaryotic initiation factor 2α kinase</i>
PREDIMED	<i>PREvención con Dieta MEDiterránea</i>
PUFA	Ácido Graxo Poli-insaturado
PURE	Estudo Prospectivo Epidemiológico Rural Urbano
RE	Retículo endoplasmático
SGLT	Co-transportador de sódio-glicose
SM	Síndrome Metabólica
SOD	Superóxido Dismutase
SRA	Sistema Renina Angiotensina
TG	Triglicerídeos
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
TRAF2	<i>TNF Receptor Associated Factor 2</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
VE	Ventrículo Esquerdo
VLDLr	Receptor de lipoproteína de intensidade muito baixa
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	14
1	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1	Dieta Hiperlipídica e Doenças cardiovasculares.....	16
1.2	Doenças cardiovasculares.....	19
1.2.1	<u>Hipertrofia cardíaca.....</u>	22
1.3	Sistema Renina Angiotensina.....	25
1.3.1	<u>Histórico.....</u>	28
1.3.2	<u>Sistema Renina Angiotensina Local (coração).....</u>	29
1.4	Estresse do retículo endoplasmático.....	33
1.5	Os inibidores do co-transportador de sódio-glicose do tipo 2.....	35
1.5.1	<u>Empagliflozina.....</u>	38
2	OBJETIVOS.....	41
2.1	Objetivo Geral.....	41
2.2	Objetivos Específicos.....	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1	Animais e dietas.....	42
3.2	Ingestão alimentar e hídrica e massa corporal.....	44
3.3	Glicose urinária.....	44
3.4	Ácido úrico (urinário e plasmático).....	44
3.5	Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG).....	45
3.6	Análise da Insulina plasmática e HOMA-IR.....	45
3.7	Pressão arterial sistólica.....	45
3.8	Morte dos animais.....	46
3.9	Bioquímica plasmática.....	46
3.10	Estereologia e morfometria do VE.....	46
3.11	Dosagem de hidroxiprolina.....	48
3.12	RT-qPCR (Transcriptase reversa-PCR quantitativo).....	49
3.13	Análise de dados.....	51
4	RESULTADOS.....	52
4.1	Massa corporal. (MC).....	52

4.2	Ingestão alimentar	53
4.3	Ingestão hídrica	54
4.4	Volume urinário	54
4.5	Glicose urinária	55
4.6	Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)	56
4.7	Glicemia de jejum	57
4.8	Insulina plasmática	58
4.9	HOMA-IR	58
4.10	Pressão arterial sistólica	59
4.11	Bioquímica plasmática	60
4.11.1	<u>Triglicerídeos</u>	60
4.11.2	<u>Colesterol total</u>	61
4.12	Ácido úrico	61
4.12.1	<u>Ácido úrico plasmático</u>	61
4.12.2	<u>Ácido úrico urinário</u>	61
4.13	Coração	62
4.13.1	<u>Massa do coração e do VE</u>	62
4.13.2	<u>Hidroxiprolina</u>	63
4.13.3	<u>Espessura ventricular esquerda</u>	63
4.13.4	<u>Área seccional média dos cardiomiócitos – A[car]</u>	63
4.14	PCR	66
4.14.1	<u>Sistema Renina Angiotensina – VE</u>	66
4.14.2	<u>Estresse do Retículo Endoplasmático – ERE</u>	68
4.14.3	<u>Estresse Oxidativo</u>	69
4.14.4	<u>Gotícula lipídica (<i>Plin2</i>)</u>	71
5	DISCUSSÃO	73
	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXO A – Comitê de ética	97
	ANEXO B – Comprovante de submissão do artigo	98

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morte no mundo, e a cada ano mais pessoas morrem de DCVs do que qualquer outra causa, a obesidade é a terceira principal causa de morte por doenças não transmissíveis no mundo, atrás apenas das DCVs (1º lugar) e câncer (2º lugar). Além disso, a obesidade, atua, juntamente com o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), como fator de risco para o desenvolvimento de DCV, afetando a estrutura e função cardíaca (Htay *et al.*, 2019).

Os tratamentos atuais para DM2 são baseados em controle glicêmico rigoroso, mas ainda não foi relatado um bom efeito na redução das DCVs, deixando frequentemente um risco vascular residual (Giugliano *et al.*, 2018). Em 2008, a *Food and Drug Administration* publicou diretrizes para garantir que os medicamentos para DM2 tivessem segurança cardiovascular como pré-requisito. Nesse contexto, foi desenvolvido uma nova classe de agentes anti-hiperglicêmicos, os inibidores co-transportadores de sódio e glicose tipo 2 (SGLT-2i), que inibem concomitantemente a reabsorção de glicose e sódio no túbulo contorcido proximal renal (Scheen, 2015), resultando em glicosúria e natriurese, que se traduz em uma redução aproximada de 0,7 a 1% na hemoglobina glicada, uma redução de 5/2 mmHg na pressão arterial (PA) e uma redução de 2 a 3 kg na massa corporal (Heerspink *et al.*, 2016).

Os benefícios cardiorrenais dos inibidores da SGLT2 são multidimensionais (Kuriyama, 2019) e a empagliflozina foi o primeiro fármaco da classe a mostrar uma redução significativa no risco de DCV (Zinman *et al.*, 2015). Supõe-se que a perda de peso causada pelo medicamento reduz o volume plasmático em aproximadamente 7% e possa minimizar a carga cardíaca, resultando em melhorias cardiovasculares (Abdul-Ghani *et al.*, 2016). Foi relatado que a empagliflozina diminui a fibrose cardíaca, parede arteriolar e estresse oxidativo cardiovascular em camundongos obesos (Lin *et al.*, 2014), reduzindo também o peso do ventrículo esquerdo (VE) e o diâmetro dos cardiomiócitos (Kusaka *et al.*, 2016).

Outro alvo da empagliflozina é o sistema renina angiotensina (SRA). Cerca de 14% dos pacientes com DM2 e hipertensão resistente têm uma hipersecreção

do SRA parcial ou completamente autônoma de aldosterona (Umpierrez *et al.*, 2007). No EMPA-REG-OUTCOME, essa ativação não pode ser facilmente demonstrada, uma vez que a grande maioria dos pacientes recebe tratamentos que bloqueiam a atividade do SRA (Zinman *et al.*, 2015), conseqüentemente, a redução na mortalidade CV pode ser consequência de uma interação farmacológica (SGLT2i + RASi) (Muskiet *et al.*, 2015).

O SRA também foi descrito como associado à estimulação intracelular da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), estimulando Nox2 (NADPH oxidase do tipo 2) e Nox4 (NADPH oxidase do tipo 4) e inibindo SOD (Superóxido dismutase) e catalase (He *et al.*, 2015). Esse estresse atua aumentando a hipertrofia cardíaca (HC) e a PA, ambos fatores que aumentam o estímulo ao estresse do retículo endoplasmático (ERE) (Young, 2017; Menikdiwela *et al.*, 2019). Contudo, sabe-se que há um aumento na atividade das vias circulatórias e locais do SRA após o uso de SGLT2i. Além disso, a atividade do SRA local, no tecido cardíaco, mostra ativação da via contra-regulatória via Ang (1-7)-receptor Mas levando a vasodilatação, efeitos anti-inflamatórios e efeitos inotrópicos positivos (He *et al.*, 2015).

A hipótese de que o efeito cardioprotetor do SGLT-2i esteja relacionado a uma ativação do SRA é fascinante, mas até agora dificilmente suportada por evidências experimentais. Sendo assim, a hipótese do presente estudo é que o tratamento com empagliflozina pode ter efeitos sobre o SRA local do VE contribuindo para a redução das alterações cardíacas causadas por uma dieta rica em lipídeos e conseqüente mudanças na massa corporal, glicose sanguínea, PA e alteração no estresse oxidativo e ERE.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Dieta Hiperlipídica e Doenças cardiovasculares

Hábitos alimentares não saudáveis são um fator de risco para doenças não transmissíveis em todo o mundo, incluindo DM2, DCVs e até mesmo alguns tipos de câncer (Ley *et al.*, 2014; 2017a; Pan *et al.*, 2018). As demandas calóricas do corpo são supridas principalmente por carboidratos e gorduras (Trumbo *et al.*, 2002). Além da quantidade, as fontes alimentares e tipos de macronutrientes são também importantes na compreensão de suas associações com os riscos de doenças (Sacks *et al.*, 2017; Ludwig *et al.*, 2018; Reynolds *et al.*, 2019).

A primeira evidência de que alterações dietéticas poderia influenciar tanto o início quanto a progressão das DCVs surgiu em 1908 do cientista russo Alexander Ingatowski, que demonstrou que a alta ingestão de colesterol causava o desenvolvimento de aterosclerose em coelhos (Konstantinov e Jankovic, 2013). Desde então, foram publicados muitos estudos que confirmaram o papel de uma dieta rica em gordura na patogênese da aterosclerose, levando à formulação da hipótese do colesterol (Keys, 1957).

Após essas observações, os primeiros estudos começaram a se desenvolver, como o pioneiro *The Seven Countries Study*, que forneceu mais informações sobre o impacto da ingestão de diferentes lipídios nas DCVs (Kromhout *et al.*, 1995; Keys, 1997). Consequentemente, em 1957, quando o Comitê de Nutrição da *American Heart Association* (AHA) divulgou as primeiras recomendações alimentares, eles reconheceram que “a dieta pode desempenhar um papel importante na patogênese da aterosclerose e o teor de gordura e as calorias totais da dieta provavelmente são importantes fatores” (Page *et al.*, 1957). Isso constituiu um marco da abordagem baseada em nutrientes para a prevenção e tratamento da DCVs (Ravera *et al.*, 2016).

Desde 1961, a AHA recomenda a redução da gordura saturada na dieta para reduzir o risco de DCVs (1961). A lógica científica para diminuir a gordura saturada na dieta tem sido e permanece baseada em efeitos bem estabelecidos da gordura saturada para aumentar a lipoproteína de baixa densidade (LDL), uma das principais

causas de aterosclerose e outras alterações relacionadas às DCVs (Nettleton *et al.*, 2016).

Os mecanismos subjacentes aos efeitos da gordura presente na dieta nas DCVs permanecem incertos. A gordura saturada pode contribuir para as DCVs por meio de mecanismos de estresse inflamatório e oxidativo. Enquanto, o ácido graxo poliinsaturado (PUFA) pode diminuir a produção de espécies inflamatórias e reativas de oxigênio (Calder, 2006), o ácido graxo saturado (AGS) e os ácidos graxos trans (AGT) podem aumentar o estresse pró-inflamatório e oxidativo (Munoz e Costa, 2013; Longhi *et al.*, 2018) contribuindo para o desenvolvimento de DCVs (Sverdlov *et al.*, 2016; Ruparelia *et al.*, 2017).

Estudos prévios investigaram a relação entre gordura da dieta e risco cardiovascular (Houston *et al.*, 2011; Estruch *et al.*, 2013; Guasch-Ferre *et al.*, 2015), o estudo *PREvención con Dieta MEDiterránea* (PREDIMED) demonstrou que as dietas mediterrâneas, ricas em PUFA e ácido graxo monoinsaturado (MUFA), com baixo teor de AGS e AGT, foram associados a eventos reduzidos de DCVs (Estruch *et al.*, 2013). Por outro lado, o estudo Prospectivo Epidemiológico Rural Urbano (PURE) relatou que a gordura total e os tipos de gordura não estavam associados a DCVs ou mortalidade, no entanto, a gordura saturada apresentava uma associação inversa a quantidade de acidente vascular cerebral (AVC) (Dehghan *et al.*, 2017). Esses estudos avaliando o impacto da ingestão de gordura saturada na saúde metabólica são inconclusivos, com resultados amplamente variáveis (Houston, 2018). Outro exemplo é um estudo prospectivo recente, que demonstrou que a ingestão de gordura saturada de cadeia longa estava positivamente associada ao risco de mortalidade, enquanto o consumo de AGS de cadeia média estava negativamente associado ao risco de mortalidade (Zhuang *et al.*, 2019). Claramente, essas discrepâncias provavelmente se devem, em parte, à heterogeneidade do AGS, já que esses podem variar significativamente em comprimento e estrutura do carbono dependendo da fonte da dieta (Bainbridge *et al.*, 2016).

A Diretriz da AHA/*American College of Cardiology* de 2013 sobre gerenciamento de estilo de vida para reduzir o risco cardiovascular (Jensen *et al.*, 2014) recomenda um padrão alimentar de 5 a 6% das calorias provenientes dos ácidos graxos saturados para redução do colesterol LDL. A Organização Mundial de Saúde (OMS) e as Diretrizes Dietéticas para Americanos de 2010 recomendam limitar a ingestão dos AGS em menos de 10% da energia total da dieta (McGuire, 2011).

Além disso, as Diretrizes Dietéticas para Americanos de 2010 recomendam a redução de AGS para <7% de energia, a fim de obter uma redução adicional do risco de DCV. As recomendações brasileiras da I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular seguem a mesma linha (Santos *et al.*, 2013).

Dietas hiperlipídicas têm recebido atenção devido ao seu potencial impacto na saúde, o excesso de lipídios, ou seus metabólitos e derivados, por exemplo, prejudica a sinalização da insulina e ativa a inflamação hepática, muscular esquelética e cardíaca. A resistência à insulina está intrinsecamente ligada a um metabolismo desregulado de AGS (Gueant *et al.*, 2014).

A lipotoxicidade cardíaca é o resultado de um desequilíbrio entre a captação e utilização de lipídios, geralmente manifestada como lipídio acumulado no miocárdio (Li *et al.*, 2018b). O acúmulo intracelular de lipídios do miocárdio ocorre após o infarto do miocárdio (IM), o que diminui a função cardíaca. A expressão do receptor VLDL (VLDLr) promove o acúmulo total de triglicerídeos (TG) e aumenta a mortalidade em camundongos, aumentando o ERE em cardiomiócitos hipóxicos e corações isquêmicos. O ERE e o acúmulo de lipídios são diminuídos nos camundongos *knockout* para VLDLr, seguidos por lipotoxicidade cardíaca melhorada, remodelação patológica e função cardíaca, o que sugere que a normalização das concentrações de lipídios pela inibição do ERE após o IM pode melhorar a função miocárdica e servir como alvo para o tratamento da lipotoxicidade cardíaca (Perman *et al.*, 2011).

A ingestão excessiva de gordura predispõe a um risco maior de lipidemia pós-prandial prejudicada, que desencadeia um estado pró-inflamatório e resulta em aumento do risco DCVs (Astrup *et al.*, 2011). Entretanto, diferentes efeitos são causados por diferentes tipos de gordura consumida, também dependendo dos polimorfismos genéticos (Kremmyda *et al.*, 2011). O aumento da ingestão de AGS está ligado ao aumento do colesterol LDL plasmático e ao aumento do risco de DCV (Astrup *et al.*, 2011), assim como os AGT (Tardy *et al.*, 2011).

Por outro lado, a alta ingestão de MUFA, como azeite, tem se mostrado cardioprotetora, resultando em aumento do colesterol HDL e diminuição do colesterol LDL (Gillingham *et al.*, 2011). No que diz respeito aos PUFAs, vários estudos demonstraram que seu efeito é benéfico comparado aos AGS (Astrup *et al.*, 2011).

Em modelo experimental, a dieta hiperlipídica (*high-fat diet* - HF) ou *western diet*, exerce efeitos negativos, aumentando o peso corporal e a deposição de gordura, aumentando a concentração de glicose, lipídios e ácido úrico sanguíneos, causando

resistência à insulina e elevando a pressão sanguínea (Fraulob *et al.*, 2010; Frantz *et al.*, 2014; de Oliveira Sa *et al.*, 2017; Camelo *et al.*, 2019; Petito-da-Silva *et al.*, 2019).

Especificamente no coração, esse tipo de dieta parece promover uma HC mal-adaptativa, resultando em contratilidade prejudicada sob condições basais (Fang *et al.*, 2008; Calligaris *et al.*, 2013), aumento a suscetibilidade do miocárdio à isquemia (Thakker *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014), aumento de estresse oxidativo (Boudina e Abel, 2010), ativação de sinalização adrenérgica (Iuchi *et al.*, 2017) e formação de placa aterosclerótica (Leng *et al.*, 2016). Estudos anteriores do nosso grupo utilizando camundongos C57BL6, mostram a influência da dieta HF aumentando a massa do coração, a espessura da parede do VE, hipertrofia de cardiomiócitos, e expressão de genes relacionados à via clássica do SRA (de Oliveira Sa *et al.*, 2017; Camelo *et al.*, 2019).

1.2 Doenças Cardiovasculares

Entre 2005 e 2015, as mortes por DCVs aumentaram cerca de 12,5%, e hoje, correspondem a 1/3 de todas as mortes globalmente. Por outro lado, as mortes por DCVs relacionadas à idade diminuíram 15,6% nesse mesmo período. Mais de 95% são atribuíveis a doença cardíaca isquêmica, AVC, hipertensão, cardiopatia (que resulta em insuficiência cardíaca), cardiomiopatia, cardiopatia reumática e fibrilação atrial (Joseph *et al.*, 2017).

É estimado que por ano 700 mil pessoas morram por doenças cardiometabólicas nos Estados Unidos e 50% dessas mortes são diretamente relacionadas à dieta (Yu *et al.*, 2018). 64% dos americanos obesos e diabéticos desenvolvem alguma complicação cardiovascular (Bhupathiraju e Hu, 2016). Nos Estados Unidos, Europa e Austrália a prevalência de hipertensão está entre 60 e 75% (2017b). No Brasil, as DCVs são a maior causa de morte no país, correspondendo em 2011 a 31% de todas as mortes no país (Ribeiro *et al.*, 2016).

Entre os fatores de risco para desenvolvimento das DCVs estão o fumo, excesso de peso corporal, baixa prática de atividade física e consumo excessivo de álcool. Esses comportamentos são frequentemente relacionados a características

socio econômicas, psicológicas e fatores biológicos, como idade e raça (Niakouei *et al.*, 2020).

Além disso, condições como diabetes, pressão alta, aterosclerose, hipercolesterolemia, ácido úrico plasmático elevado, disfunção endotelial, estresse oxidativo e inflamação também estão relacionadas com o risco de DCVs, e muitas vezes podem ser prevenidas por hábitos alimentares mais saudáveis e prática de atividade física (2002; Maloberti *et al.*, 2020).

A Síndrome Metabólica (SM) está presente em cerca de 20-30% da população geral e é definida por um conjunto de fatores de risco cardiovascular que incluem hipertensão arterial, obesidade abdominal, alto colesterol LDL, TG e glicemia de jejum elevados. Pelo menos três desses fatores devem estar presentes para o diagnóstico da SM (Santilli *et al.*, 2017). Sozinha, a SM, é capaz de aumentar em duas vezes o risco de desenvolver DCVs (Despres e Lemieux, 2006). Pacientes obesos com diabetes e hipertensão tem uma incidência de cardiopatia isquêmica maior que 30% (Zekry *et al.*, 2012), além de apresentarem trombose venosa profunda e artrite periférica (Piazza *et al.*, 2012). Em 2015, 17.92 milhões de pessoas morreram por DCV, sendo 80% dessas mortes ocorridas em países de baixa e média renda (Roth *et al.*, 2017).

Além disso, estudos recentes demonstraram que o ERE tem uma estreita relação com o metabolismo lipídico e as DCV (Drevinge *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2018b). Algumas evidências sugerem que quando insulina de jejum, apolipoproteína B e LDL estão aumentados, o risco de DCV é maior do que seria calculado usando apenas fatores de risco tradicionais, como idade, sexo, tabagismo, PA, colesterol e diabetes.

Em alguns pacientes diabéticos obesos, a cardiomiopatia diabética (CMD) se apresenta como caracterizada por disfunção contrátil específica do músculo cardíaco (Boudina e Abel, 2010). Em roedores obesos e diabéticos, o início da CMD inclui disfunção diastólica (Basu *et al.*, 2009), hipertrofia dos cardiomiócitos, fibrose intersticial (Li *et al.*, 2012) e acúmulo progressivo de lipídios (Pulinilkunnil *et al.*, 2013), o que são sintomas precursores de insuficiência cardíaca (Trivedi *et al.*, 2016).

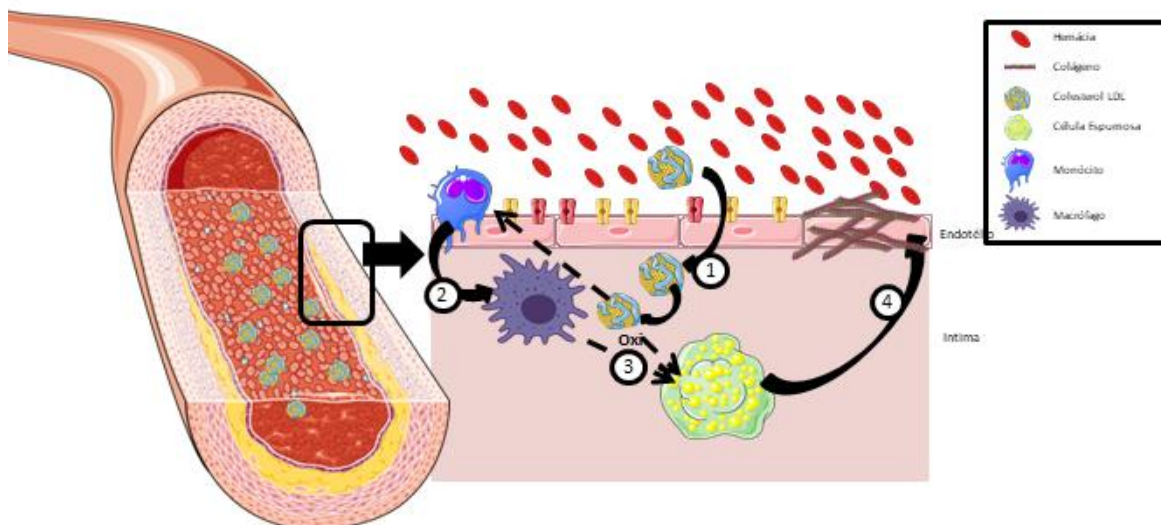
Em 1953, Ancel Keys publicou uma proposta de ligação entre a gordura da dieta e as DCVs (Keys, 1953). Nesse estudo, Ancel mostra uma ligação da dieta com o aumento do colesterol sanguíneo e discute a influência desse colesterol no desenvolvimento de aterosclerose e comorbidades associadas, tal como a diabetes.

Com isso, por muitas décadas, a etiologia das DCVs esteve associada ao consumo de gorduras alimentares, em especial aos AGS (Beermann *et al.*, 2003). Mas, certos produtos que contêm gordura saturada, como laticínios, nozes e óleos vegetais, na verdade podem promover uma melhor saúde cardiovascular (Del Razo Olvera *et al.*, 2017). Um estudo feito com 7500 indivíduos com alto risco de DCV consumindo uma dieta mediterrânea, rica nesses alimentos, demonstrou uma redução de 30% no risco de DCV (Estruch *et al.*, 2018).

A relação gordura saturada e fator de risco cardiovascular é demonstrada tanto em humanos quanto em roedores, onde um aumento na saturação de gordura na dieta contribui para aumentar a PA sistólica e diastólica (Grimsaard *et al.*, 1999; Tamaya-Mori *et al.*, 2002). A sobrecarga de AG danifica o miocárdio através da alta oxidação e acúmulo de espécies lipídicas tóxicas no miocárdio (Duncan, 2008), apresentando lipotoxicidade (Unger, 2003).

A oxidação do LDL, formando ox-LDL, é responsável por uma resposta inflamatória que aumenta a expressão de molécula de adesão celular vascular-1, a seletina E e a seletina P no endotélio. Essa resposta fornece as condições necessárias para a quimiotaxia, onde as células sanguíneas são recrutadas para o local lesionado, como a parede arterial no caso de arteriosclerose. Após a entrada na túnica íntima, os monócitos sofrem diferenciação em macrófagos, que absorvem o ox-LDL para se transformar em células espumosas. As células espumosas funcionam como células apresentadoras de antígenos e ativam monócitos e células T circulantes. Eles também secretam mediadores para perpetuar ainda mais a inflamação e estimulam a migração de células musculares lisas para o espaço subendotelial contribuindo para o aumento da proliferação de células musculares lisas e formação de fibrose. Esse fenômeno pode ocorrer tanto na parede de vasos sanguíneos, aumentando sua rigidez, quanto na parede do coração (Lee *et al.*, 2017), figura 1.

Figura1: Evolução da placa aterosclerótica



Legenda: A partícula de LDL (1) entra na túnica íntima dos vasos atraindo monócitos que se diferenciam em macrófagos (2). O LDL oxidado é fagocitado pelo macrófago, que se transforma em célula espumosa (3) induzindo a diferenciação de fibroblastos no endotélio vascular e levando a um espessamento da mesma através da deposição de colágeno (4).

Fonte: O autor

1.2.1 Hipertrofia cardíaca

A HC pode ser uma resposta adaptativa à sobrecarga de pressão ou volume, e é uma causa independente de mortalidade por DCV (Walsh-Wilkinson *et al.*, 2019), ou um processo fisiopatológico essencial que leva à insuficiência cardíaca, hipertensão e IM (Riaz *et al.*, 2017). Embora as etiologias dessas doenças sejam diferentes, elas compartilham várias vias em termos de eventos moleculares, bioquímicos e mecânicos (Cohn *et al.*, 2000).

Vários distúrbios herdados do metabolismo de AG são caracterizados por HC e CMD (Kelly e Strauss, 1994). Isso foi relatado em um estudo em que foi demonstrado que o excesso de AGS e/ou PUFA na alimentação modifica claramente a expressão dos genes associados à hipertrofia, sobrecarregado pelo aumento de pressão ativando a proteína ativadora 1 (AP1) e as vias de transdução de sinal da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) (Foldes *et al.*, 2006). A qualidade da gordura também molda a estrutura cardíaca, ativando e alterando fatores específicos do coração. Uma dieta com uma mistura adequada de AGs, rica em AGs benéficos e pobre em AGs prejudiciais, é necessária para manter a saúde cardíaca (Cerf, 2018). Contudo, vários mecanismos biológicos têm sido implicados no remodelamento

cardíaco induzido pela obesidade, incluindo estresse oxidativo, vias inflamatórias, sinalização de insulina e ativação do SRA (Lima *et al.*, 2019).

O remodelamento cardíaco pode ser definido como alterações moleculares, celulares, intersticiais e na expressão do genoma que se manifestam clinicamente como alterações no tamanho, forma e função do coração após lesão cardíaca. O processo de remodelação cardíaca é influenciado por carga hemodinâmica, ativação neuro-hormonal, SRA e outros fatores ainda sob investigação. O miócito é a principal célula cardíaca envolvida no processo de remodelação. Outros componentes envolvidos incluem o interstício, fibroblastos, colágeno e vasculatura coronária; processos relevantes também incluem isquemia, necrose celular e apoptose (Cohn *et al.*, 2000).

A remodelação da matriz extracelular (MEC) é um importante colaborador da remodelação cardíaca. O rompimento da estrutura da rede da MEC interrompe a conexão entre cardiomiócitos e vasos sanguíneos, comprometendo a integridade estrutural e a função do coração. Um excesso de produção e o acúmulo de proteínas estruturais da MEC resultam em maior rigidez do miocárdio e impedem a contração e o relaxamento ventriculares, levando à arquitetura e função distorcidas do coração (Lu *et al.*, 2011).

A manutenção de um sistema cardíaco saudável depende da biossíntese controlada, maturação, função e quebra de proteínas da MEC. A remodelação da MEC ocorre através de uma variedade de modificações pós-traducionais, que podem ser enzimáticas ou não enzimáticas. Entre as modificações enzimáticas, o processamento e a degradação proteolítica estão entre os mais importantes. Por meio da proteólise, proteases como catepsinas e metaloproteinases (MMPs) liberam fatores bioativos, que influenciam o crescimento, a morfogênese e os processos patológicos, modificando a estrutura da MEC. Embora a atividade proteolítica permita a degradação de proteínas mal dobradas ou com mau funcionamento, a desregulação dessas enzimas proteolíticas pode causar um desequilíbrio entre a síntese e a degradação das proteínas da MEC, como o colágeno, resultando em remodelação descontrolada (Riaz *et al.*, 2017).

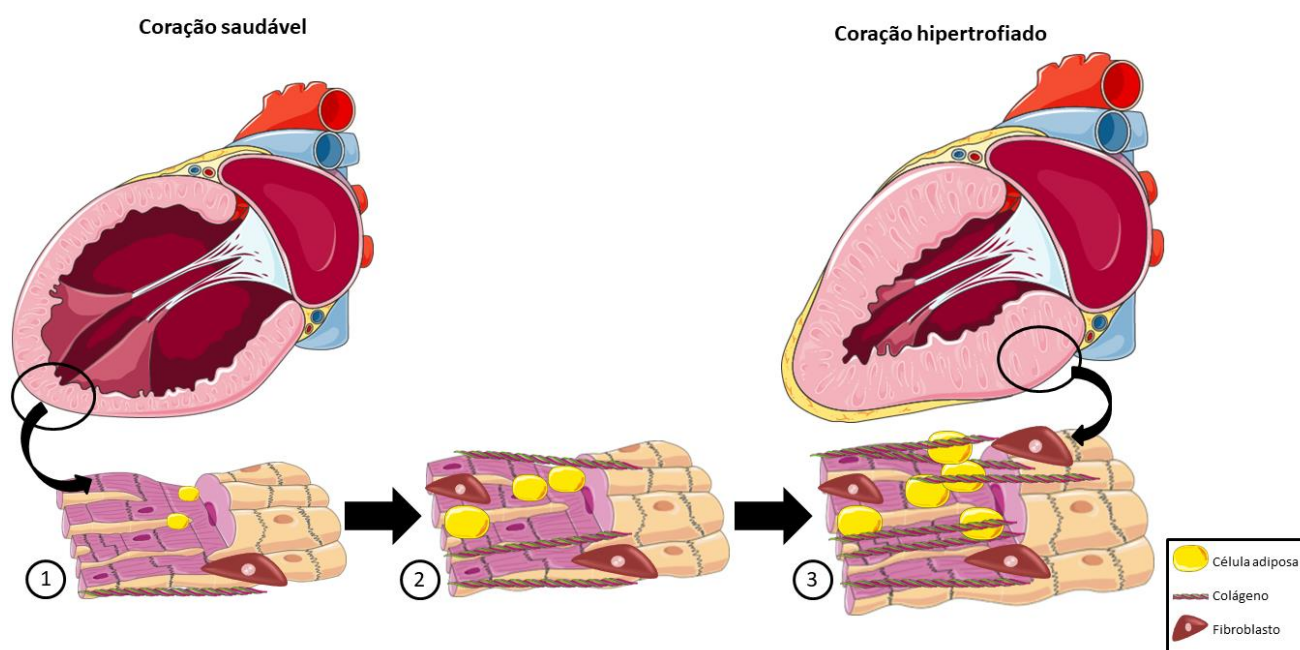
MMP-1 e MMP-13 são capazes de degradar o colágeno intacto e proteoglicanos (Riaz *et al.*, 2017). Em um modelo de ratos com CMD foram relatadas concentrações aumentadas de mRNA de MMP-2, MMP-9 e TIMP-1 (*tissue inhibitor of MMP*) duas semanas após a indução (Matsumoto *et al.*, 2009). Já é claro na literatura

que a ativação diferencial de MMPs específicas resulta na progressão do remodelamento cardíaco (Riaz *et al.*, 2017).

O miocárdio contém colágeno tipos I e III como principais colágenos fibrilares. Esses colágenos são constantemente sintetizados e secretados como pro-colágenos no espaço intersticial. O aumento da renovação do colágeno tem sido associado à fibrose miocárdica e desempenha um papel importante na determinação das propriedades funcionais da vasculatura arterial e do miocárdio ventricular. Um acúmulo exagerado de colágenos fibrilares tipo I e III ocorrem em toda a parede livre e septo interventricular de pacientes com hipertensão primária e hipertrofia do VE (dos Santos Moreira *et al.*, 2015), figura 2.

O excesso de colágeno do miocárdio observado na hipertensão é um resultado do aumento da síntese de colágeno e da degradação inalterada ou diminuída. O desenvolvimento dessa hipertrofia depende tanto do SRA, que gera angiotensina II (Moniwa *et al.*, 2013), quanto do estresse mecânico que ativa uma via de fosforilação via proteína quinase nos cardiomiócitos (dos Santos Moreira *et al.*, 2015).

Figura 2: Hipertrofia do ventrículo esquerdo.



Legenda: Coração saudável (1), após receber uma dieta rica em gordura, aumenta a quantidade de gotículas de gordura no coração e também o tamanho dessas gotículas (2), além disso, existe uma desordem na produção-degradação de colágeno, que se acumula no interstício celular. Junto com isso os cardiomiócitos aumentam de tamanho (3). A hipertrofia dos cardiomiócitos somada ao acúmulo de colágeno intersticial forma uma rede fibrótica no ventrículo esquerdo.

Fonte: O autor

1.3 Sistema Renina Angiotensina

Como o nome indica, renina e angiotensina são dois componentes críticos que formam o sistema. A renina é secretada pelas células justa glomerulares nos rins (Gomez e Sequeira-Lopez, 2018). O precursor da renina, chamado pró-renina, é uma proteína de 406 aminoácidos de comprimento, cujo processamento forma a proteína ativa (Wu *et al.*, 2008). A pró-renina pode ser ativada proteoliticamente no rim pela convertase 1 neuroendócrina ou catepsina B e não proteoliticamente em muitos tecidos pelo receptor renina/pró-renina. A renina, em sua forma ativa, possui 340 aminoácidos (Bouhnik *et al.*, 1987). Essa enzima também é considerada um hormônio, por suas funções de sinalização (Brown, 2007). Baixa PA, cloreto de sódio baixo e atividade do sistema nervoso simpático levam à sua expressão (Drenjancevic-Peric *et al.*, 2011). Sua função é a hidrólise do angiotensinogênio, secretado pelo fígado, em angiotensina I (Ang I) (Verdecchia *et al.*, 2008). O nível plasmático de angiotensinogênio pode ser aumentado pelas concentrações de corticosteroide, estrogênio, hormônio tireoidiano e angiotensina II (Ang II) (Verdecchia *et al.*, 2008). A Ang I sofre uma quebra nos capilares pulmonares, células endoteliais e células epiteliais renais pela enzima conversora de angiotensina ligada ao endotélio (ECA1). Essa enzima, uma carboxipeptidase converte a Ang I no peptídeo Ang II (Bernstein *et al.*, 2014). A Ang II é uma molécula efetora versátil, com papel autócrino e parácrino, que cruza quase todos os sistemas (Peach e Dostal, 1990; Durante *et al.*, 2012). Figura 3.

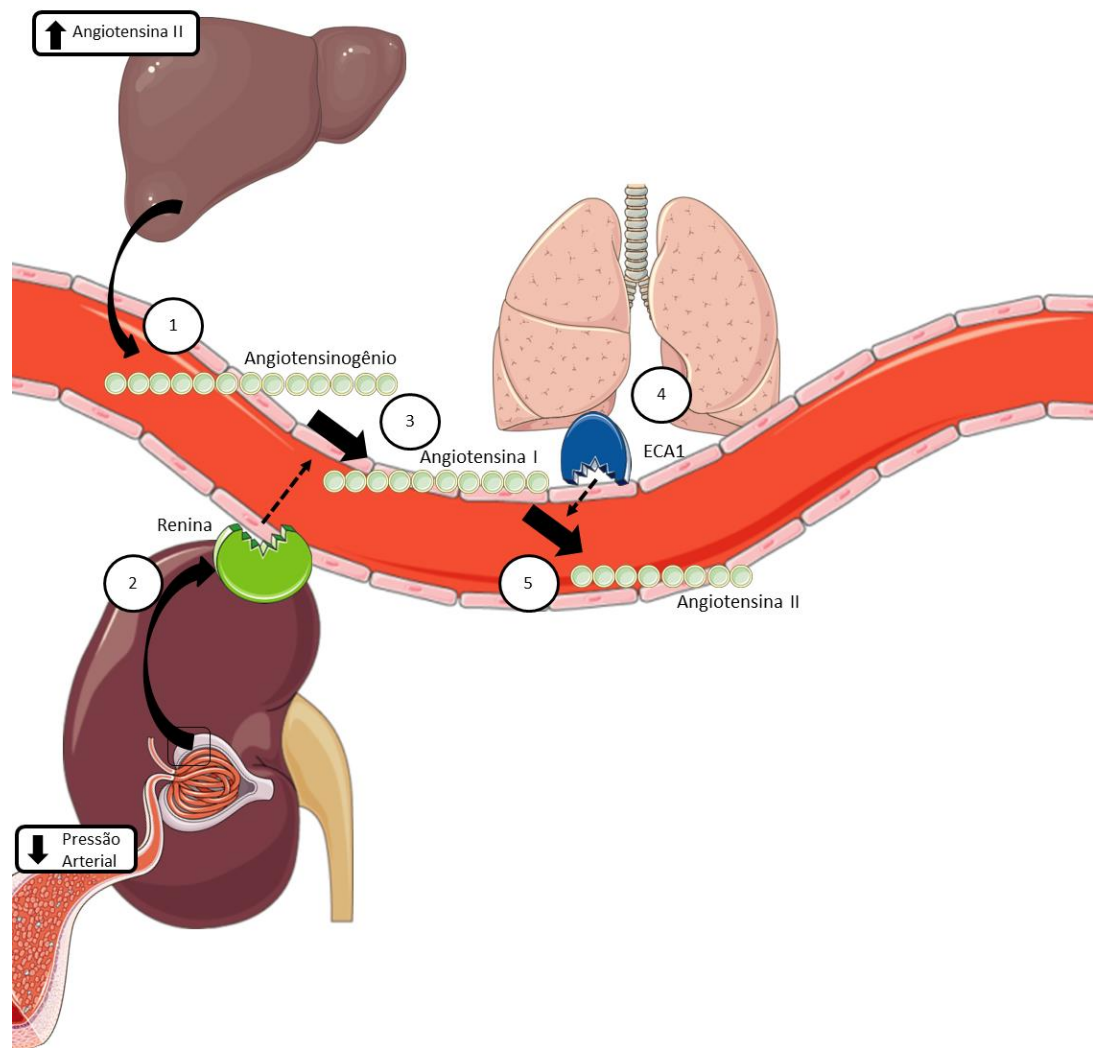
Os mecanismos funcionais da Ang II foram estudados extensivamente, ela interage com um receptor acoplado à proteína G chamado receptor de angiotensina do tipo 1 (AT1), estimulando a proteína Gq nas células do músculo liso vascular para ativar a fosfolipase C, aumentando o cálcio intracelular e ativando a via das MAPK (Berk e Corson, 1997).

Também existem outras formas degradadas da Ang II que dão origem a uma segunda via do SRA, contra regulando a via clássica, descrita acima. Nessa via, a Ang II sofre degradação pela enzima conversora de angiotensina do tipo 2 (ECA2) (Wysocki *et al.*, 2010; Deshotels *et al.*, 2014; Varagic *et al.*, 2014). Os substratos identificados para ECA2 incluem Ang I e Ang II, que são clivados respectivamente em um nonapeptídeo, a Ang (1-9), e um heptapeptídeo, a Ang (1-7). A conversão de Ang II em Ang (1-7) é a via de preferência, com uma eficiência 500 vezes maior em

comparação com a via de clivagem Ang I (Tipnis *et al.*, 2000; Crackower *et al.*, 2002; Ferrario, 2006). A ligação de Ang (1-7) ao receptor Mas, também acoplado à proteína G, leva à inibição da atividade da ERK1/2 MAPK, de forma contrária a ação de Ang II no receptor AT1, que estimula essa via (Gallagher *et al.*, 2008).

Ainda nessa via não clássica, a Ang II pode agir através do receptor de angiotensina do tipo 2 (AT2) tendo efeitos opostos aos estimulados por AT1. Os mecanismos de sinalização mediados pela ligação da Ang II aos receptores AT2 são pouco definidos. Uma revisão de Carey e colaboradores relata que a ligação de Ang II aos receptores AT2 resulta na ativação da fosfotirosina fosfatase e consequente inibição da via das MAPK (Carey *et al.*, 2000), assim como ocorre na ligação de Ang(1-7) ao receptor Mas.

Figura 3: Via do Sistema Renina Angiotensina



Legenda: O fígado recebe um estímulo, como por exemplo o aumento de angiotensina II e produz angiotensinogênio (1). A síntese de renina é realizada pelas células justas glomerulares, nos rins (2). Seu estímulo pode vir, por exemplo, da baixa pressão arterial. A renina age sobre o angiotensinogênio transformando-o em angiotensina I (3). Nos capilares pulmonares, a enzima conversora de angiotensina (ECA1) é sintetizada (4). A ECA1 age transformando angiotensina I em angiotensina II circulante (5). A angiotensina II é capaz de aumentar a produção de angiotensinogênio e também de aumentar a pressão sanguínea.

Fonte: O autor

1.3.1 Histórico

O SRA é um dos sistemas hormonais filogeneticamente mais antigos e, conseqüentemente, bem conservado de espécies mais primitivas para espécies altamente desenvolvidas (Liang *et al.*, 2004). Antigamente, o SRA servia principalmente para equilibrar a homeostase eletrolítica em tempos de falta de sal. Além disso, está substancialmente envolvido na manutenção da circulação corporal em situações de rápida perda de volume. Quando superativado, o SRA contribui para muitas comorbidades, como hipertensão, danos nos órgãos terminais relacionados à hipertensão, aterosclerose ou danos nos órgãos terminais diabéticos (Steckelings *et al.*, 2009).

A descoberta científica do SRA começou com Robert Tigerstedt e Bergmann, em 1898, que injetaram homogenatos renais de um coelho saudável em outro coelho saudável e observaram um aumento da pressão sanguínea (Kunikullaya *et al.*, 2012). Tigerstedt e Bergmann concluíram que o tecido renal aparentemente continha um composto pressor e -com base em sua origem- denominou a substância 'renina'.

A decifração da cascata enzimática, que leva à síntese de Ang II, só se deu entre 1939 e 1954, quando os grupos de Eduardo Braun-Menendez, de Buenos Aires, e Irvine Page, de Indianápolis, descobriram que não a renina, mas a Ang II (na época denominada hipertensina ou angiotonina) era a molécula eficaz do SRA, e quando Leonard Skeggs descreveu pela primeira vez a conversão de Ang I em Ang II pela ECA1 (Braun-Menendez *et al.*, 1940; Page e Helmer, 1940; Skeggs *et al.*, 1954).

No entanto, as ações da angiotensina não se limitam à regulação da PA e eletrólitos. Duas descobertas importantes relacionadas ao SRA contribuíram substancialmente para uma visão muito mais ampla das capacidades do SRA: primeiro de que o SRA não é apenas um sistema hormonal circulante, mas também existem os chamados SRA locais ou teciduais com síntese local de Ang II, independentemente de qualquer suprimento de componentes do SRA sanguíneo (Ganten *et al.*, 1971) e a segunda descoberta foi de que a angiotensina também poderia agir por outro receptor mediando efeitos opostos, o receptor AT2 (Stoll *et al.*, 1995).

Meio século após a descoberta da ECA1, um novo homólogo da enzima, denominado ECA2, foi identificado (Tipnis *et al.*, 2000). A ECA1, além de converter Ang I em Ang II, inativa bradicinina, um peptídeo vasodilatador, potencializando,

assim, a resposta vasopressora mediada por Ang II (Griendling *et al.*, 1993; Phillips e de Oliveira, 2008) . A ECA2 é expressa predominantemente no coração, rins e testículos, e em um nível mais baixo em uma ampla variedade de tecidos (Crackower *et al.*, 2002; Ferrario, 2006). Juntos, ECA1 e ECA2 contrabalançam a concentração de Ang II e Ang(1-7), permitindo um equilíbrio entre seus efeitos. Finalmente, em 2003, Santos e colaboradores descreveram um receptor específico para a Ang(1-7), o receptor Mas (Santos *et al.*, 2003).

1.3.2 Sistema Renina Angiotensina Local (coração)

O avanço das técnicas de biologia molecular permitiu a identificação de um SRA de produção e ação local em diversos órgãos, incluindo vasos sanguíneos, rins, glândula suprarrenal, cérebro, hipófise anterior, útero e coração. Em particular, existia um grande interesse no estudo do SRA nos órgãos que contribuem para a homeostase cardiorrenal, ou seja, rim, adrenal, cérebro e coração (Dzau, 1987).

Enquanto o SRA circulante tem um papel crítico na preservação da homeostase cardiorrenal de curto prazo por meio de alterações no tônus vascular, liberação de aldosterona e reabsorção renal de sódio e água, o SRA cardíaco local influencia o controle a longo prazo da resistência vascular mediada pela Ang II e portanto, o fluxo sanguíneo, e efeitos de estímulo do crescimento (Varagic e Frohlich, 2002).

Todos os componentes do SRA circulante são expressos no coração. O angiotensinogênio é expresso em todas as partes do coração, inclusive nos cardiomiócitos e fibroblastos (Dzau *et al.*, 1987; Hellmann *et al.*, 1988; Dostal *et al.*, 1992). A ECA é expressa principalmente no endotélio e fibroblastos e contribui para a geração local de Ang II (Katwa *et al.*, 1995). O mRNA para renina também já foi localizado nos diferentes compartimentos cardíacos (Dzau *et al.*, 1987; Endo-Mochizuki *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995), e a renina e pró-renina circulantes são de forma eficaz captados para dentro do tecido cardíaco (van Kesteren *et al.*, 1997). Os receptores AT1 e AT2 também são expressos (Rogers *et al.*, 1986; Sechi *et al.*, 1992), e o receptor Mas está principalmente expresso em cardiomiócitos (Santos *et al.*, 2006).

Além dessas evidências, baseadas em métodos de biologia molecular, a funcionalidade do SRA cardíaco local tem sido apoiada por estudos que demonstram

efeitos cardiovasculares benéficos dos inibidores da ECA que são independentes da inibição sistêmica da ECA plasmática (Unger *et al.*, 1985). Além disso, não é comprovada uma correlação entre a eficácia dos inibidores da ECA ou bloqueadores dos receptores da angiotensina e atividade da renina plasmática, sugerindo um envolvimento mais local e direto do SRA (Varagic e Frohlich, 2002).

O SRA possui uma importante relação com a fisiopatologia da obesidade. O aumento de Ang II, atuando através do receptor AT1, estimula a via das MAPK iniciando a transcrição de genes relacionados ao crescimento celular, culminando em uma hipertrofia de cardiomiócitos (Ruwhof e van der Laarse, 2000). Esse aumento de Ang II também colabora para a resistência à insulina, SM (Cooper *et al.*, 2007) e fibrose cardíaca (Guan *et al.*, 2019). Estudos demonstram que vários componentes do SRA estão aumentados em pacientes obesos, incluindo angiotensinogênio, renina e ECA1 (Engeli *et al.*, 2005). A ECA1 além de ser responsável pelo mecanismo de vasoconstrição também é considerada relacionada com inflamação, remodelamento vascular, trombose, apoptose e eventualmente ruptura plaquetária, enquanto ECA2 é relatada como um gene anti-obesogênico (Guan *et al.*, 2019)..

Entre os processos pró-inflamatórios, os receptores AT1 podem regular a expressão da NOX (Yan *et al.*, 2015), aumentando *Nox1* (Salazar, 2018) e *Nox4* (Zhang *et al.*, 2019), nas células musculares lisas. Também aumenta a produção de EROs e diminui a expressão de enzimas anti-oxidantes, como a SOD2 (Salazar, 2018). Além disso, os receptores AT1 podem estimular a liberação de diferentes tipos de citocinas, como TNF- α (Fatores de Necrose Tumoral α), IL-6 (Interleucina-6) e MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) envolvidas no remodelamento cardíaco. Existe também a hipótese que a ativação do receptor AT1 pode estar associada ao acúmulo epicárdico de gordura e inflamação (Mascolo *et al.*, 2019).

Ainda através da ativação de AT1, a Ang II possui propriedades inotrópicas positivas (Koch-Weser, 1965) e também facilita a liberação de norepinefrina a partir das terminações nervosas simpáticas participando da contratilidade cardíaca (Dzau, 1988). A Ang II também possui efeito no crescimento e proliferação de miócitos, aumentando a síntese e massa desse tipo celular, através de uma ação direta no núcleo celular (Dzau, 1988).

Também já foi demonstrado uma ação de Ang II via ativação do receptor AT2, inibindo a proliferação e o crescimento celular, além de induzir a apoptose (Johren *et al.*, 2004). Vários relatórios demonstraram o envolvimento do receptor AT2 no controle

da homeostase cardiovascular, contribuindo para vasodilatação, natriurese, diminuição da inflamação e da proliferação dos cardiomiócitos (de Albuquerque Rocha *et al.*, 2018). A ativação do receptor AT2 promove efeitos benéficos ao sistema cardiovascular, reduzindo o tamanho do infarto e melhorando a função cardíaca após o IM (Kaschina *et al.*, 2008). Além disso, a estimulação a longo prazo do receptor AT2 reduz a PA (Ali *et al.*, 2013) e aumenta óxido nítrico (Katada e Majima, 2002) em ratos obesos, e a deleção dele impediu a HC e a fibrose induzidas por sobrecarga de pressão ou Ang II (Senbonmatsu *et al.*, 2000; Ichihara *et al.*, 2001).

Macedo e colaboradores relataram o efeito cardioprotetor de um ativador da ECA2, o aceturato de diminazeno, na hipertrofia dos cardiomiócitos (Macedo *et al.*, 2016). Qi e colaboradores relataram que o aceturato de diminazeno atenua as DCV induzidas pela isquemia, melhorando a atividade da ECA2. O aceturato de diminazeno também atenua a remodelação do VE, o infarto pós-miocárdico e desempenha um papel importante no tratamento do IM. A ECA2 ativa as células progenitoras endoteliais circulantes no sangue, o que diminui as células inflamatórias e aumenta as células progenitoras cardíacas na região de peri-infarto cardíacas (Qi *et al.*, 2013).

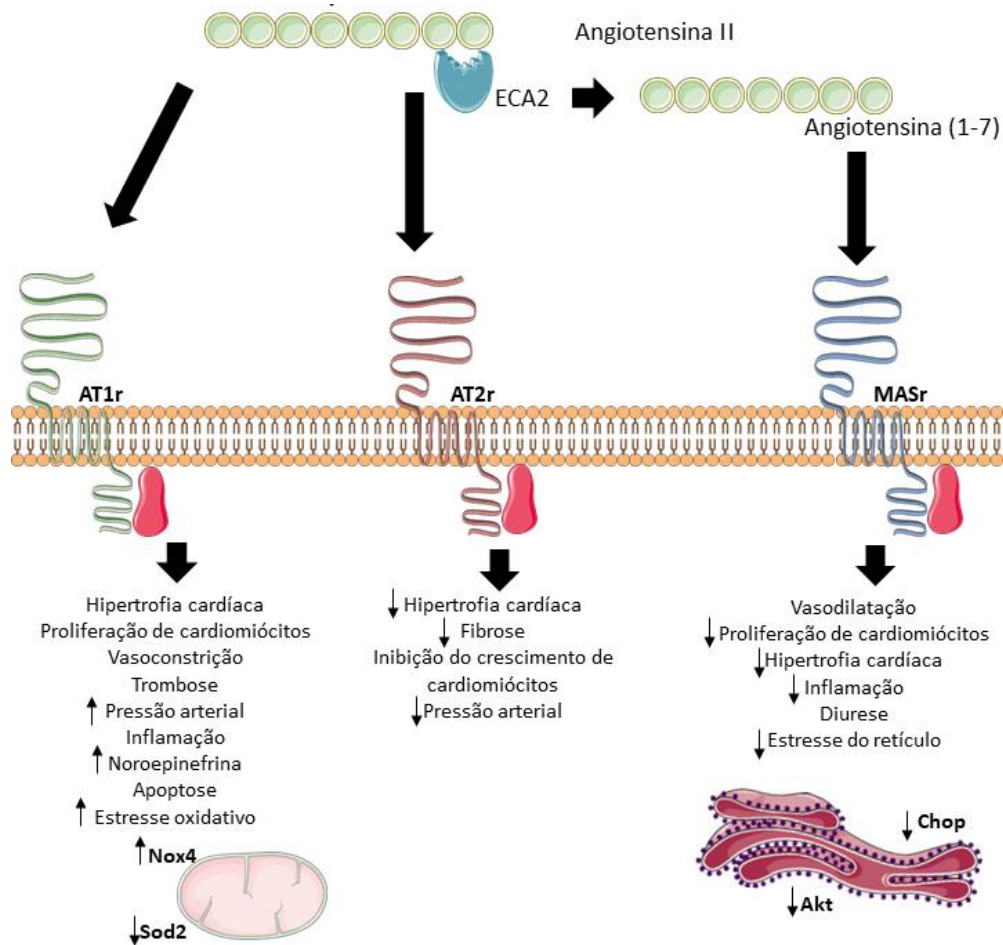
De fato, o papel da ECA2 como ponto de pivô que regula a formação dos peptídeos protetores Ang(1-9) e Ang(1-7), em parte pela diminuição das concentrações de Ang I e Ang II, respectivamente, pode representar um etapa crítica na modulação das ações da Ang II na etiopatogenia da DCVs (Ferrario, 2006).

Crackower e colaboradores (Crackower *et al.*, 2002) mostraram que a deleção de ECA2 em camundongos resulta em Ang II cardíaca e plasmática elevada, juntamente com contratilidade cardíaca prejudicada e dilatação do VE. Cao Xi e colaboradores (Cao *et al.*, 2019) também realizaram um estudo com a deleção de ECA2, relatando piora no ERE, através da diminuição de expressão de Chop (Proteína homóloga a C/EBP/ C/EBP Homologous Protein) e Akt (Proteína cinase B). Essa relação da via Ang(1-7)-receptor Mas com o ERE também já foi mostrada por Murugan e colaboradores (Murugan *et al.*, 2015).

A super expressão cardíaca da ECA2 exerce influência protetora sobre o coração durante o IM, preservando a função cardíaca, o movimento e contratilidade da parede do VE, atenuando o afinamento da parede do VE (Billingsley *et al.*, 2018), realizando vasodilatação, natriurese, diurese, redução do estresse oxidativo e da taxa de proliferação dos cardiomiócitos (Cerf, 2018). A Ang(1-7), através do receptor Mas, promove a liberação de óxido nítrico, a fosforilação de Akt, efeitos anti-inflamatórios,

anti-fibróticos e de diminuição do estresse oxidativo, através do aumento da SOD (Lin *et al.*, 2016) e contribui para remodelação cardíaca juntamente com a vasodilatação e a redução da hipertrofia, trombose (Mascolo *et al.*, 2019) e diminuição do crescimento de cardiomiócitos (Tallant *et al.*, 2005). Figura 4

Figura 4: Principais efeitos do Sistema Renina Angiotensina no coração



Legenda: Ações do Sistema Renina Angiotensina no coração através de cada um dos receptores disponíveis (AT1r, AT2r e MASr). A angiotensina II é capaz de causar hipertrofia cardíaca, proliferação de cardiomiócitos, vasoconstrição, trombose, aumento da pressão arterial, da inflamação, de noroepinefrina, apoptose e do estresse oxidativo quando age via receptor AT1. No receptor AT2, ela possui efeito contrário aqueles estimulados pelo receptor AT1. Quando a angiotensina II é convertida em Ang(1-7) pela enzima ECA2, ela passa a agir pelo receptor Mas, como ações semelhantes as do receptor AT2: vasoconstrição, diurese e diminuição da proliferação de cardiomiócitos, da hipertrofia cardíaca, inflamação e estresse do retículo endoplasmático.

Fonte: O autor

1.4 Estresse do Retículo Endoplasmático - ERE

O retículo endoplasmático (RE) é uma rede membranosa responsável pela síntese, maturação e tráfego de uma grande variedade de proteínas, homeostase do cálcio e desenvolve um papel importante no metabolismo de lipídios (Li *et al.*, 2018b). Possui um papel regulador central de proteínas dobradas e controle de qualidade (Hotamisligil, 2010).

Todas as proteínas que entram na via do RE são dobradas com o auxílio de chaperonas moleculares e então transportadas para o Complexo de Golgi. As proteínas desdobradas ou malformadas são retidas, translocadas ao citoplasma e degradadas pelos proteassomas (Yoshida, 2007).

O ERE é desencadeado por uma perda de homeostase no RE, causando o acúmulo de proteínas mal dobradas dentro do lúmen do RE. Estímulos como hipóxia, privação de glicose, alteração redox celular, acúmulo de proteínas não dobradas e/ou mal dobradas, homeostase de cálcio perturbada e alguns gatilhos químicos (Minamino *et al.*, 2010; Groenendyk *et al.*, 2013). O ERE moderado pode aumentar a capacidade do RE de lidar com o estresse inicial, no entanto, o estresse prolongado e excessivo desencadeia a morte celular apoptótica pela ativação ou regulação positiva do CHOP, caspase-12 e GADD45 (Fator indutor de dano ao DNA/ *Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45*) (Minamino *et al.*, 2010; Martinez-Pizarro *et al.*, 2016). Evidências crescentes implicam o ERE na fisiopatologia das DCVs, incluindo doença cardíaca isquêmica, aterosclerose, cardiomiopatia e insuficiência cardíaca (Groenendyk *et al.*, 2010; Minamino *et al.*, 2010).

As células respondem ao ERE ativando a resposta da proteína desdobrada (UPR; *unfolded protein response*), que consiste em três sistemas de sinalização principais iniciados pelos sensores de estresse: PERK (fator 2 de iniciação eucariótica semelhante à PKR/ *PKR-like eukaryotic initiation factor 2 α kinase*), IRE-1 (inositol

requerendo a enzima 1/ *inositol requiring enzyme 1*) e ATF6 (ativando o fator de transcrição 6/activating transcription factor 6). Cada via ativa fatores de transcrição que medeiam a indução de uma variedade de genes de resposta ao ERE, como ATF4, CHOP e XBP1 (proteína 1 de ligação à caixa X/ *X-box binding protein 1*) (Lai *et al.*, 2007). Acredita-se que todas as três proteínas transmembranares residentes no RE percebam o ERE através da ligação e liberação da Bip (proteína de ligação de imunoglobulina/ *binding immunoglobulin protein*) (Lai *et al.*, 2007).

Em um RE com o funcionamento normal e livre de estresse, estas 3 proteínas transmembranais são ligadas a Bip, em seus domínios intraluminais, permanecendo inativos (Shen *et al.*, 2002). O acúmulo de proteínas mal-dobradas e aumento de carga proteica no RE resulta no recrutamento da Bip dissociando das 3 proteínas da UPR levando a ativação destas (Li *et al.*, 2015).

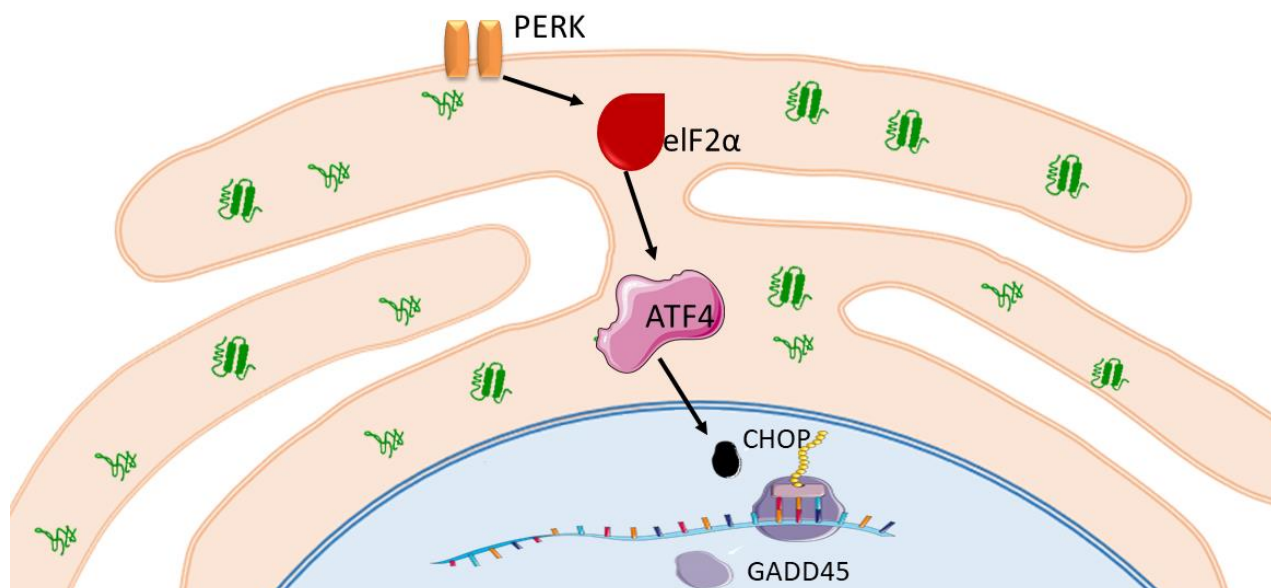
Em condições cardíacas específicas, como sobrecarga de pressão (Okada *et al.*, 2004) ou isquemia (Azfer *et al.*, 2006), possui um estímulo para o ERE que provavelmente contribui para a disfunção dos cardiomiócitos após o acúmulo de lipídios mediado pelo estresse (Han e Kaufman, 2016).

A hipertensão causa a ativação da UPR (Ge *et al.*, 2015), o objetivo principal da UPR é promover a sobrevivência dos cardiomiócitos, eliminando organelas danificadas; entretanto, sua ativação excessiva parece desencadear a morte celular, o que contribui para os principais distúrbios cardiovasculares (Mialet-Perez e Vindis, 2017).

A PERK é um transdutor de sinal transmembrana do RE e mais intimamente relacionado ao estresse oxidativo (Ochoa *et al.*, 2018). PERK é responsável pela ativação de ATF4. O ATF4 regula a tradução de proteínas durante o ERE e estimula a expressão de CHOP e GADD45, que induzem a apoptose celular (Salvador *et al.*,

2013). Portanto, o impedimento desta via de sinalização pode reduzir a apoptose de cardiomiócitos induzida por ERE e prevenir DCVs (Wu *et al.*, 2019). Figura 5

Figura 5: Via Estresse do retículo endoplasmático



Legenda: Uma dieta rica em lipídeos causa acúmulo de proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático. Esse acúmulo estimula ativação da PERK e subsequente fosforilação de eIF2 α , que irá ativar ATF4. O ATF4 estimula a transcrição de CHOP e GADD45. CHOP e GADD45 sob condições fisiológicas levam a sobrevivência celular, mas sob estresse contínuo estimulam apoptose celular.

Fonte: O autor

1.5 Os inibidores do co-transportador de sódio-glicose do tipo 2

Infelizmente, apenas menos da metade dos pacientes diabéticos recebe tratamento e menos ainda atingem níveis de glicemia que evitam a morbidade associada à doença, contribuindo assim para o desenvolvimento de complicações graves a longo prazo, macrovasculares (doença arterial coronariana e AVC e/ou microvasculares (retinopatia, neuropatia, nefropatia e outras microangiopatias), que podem ter caráter agudo ou crônico (Vieira *et al.*, 2019).

O benefício cardiovascular dos medicamentos antidiabéticos tem se tornado cada vez mais uma área de interesse. Rosiglitazona, sulfoniluréias e insulina são três antidiabéticos tradicionais que já foram, anteriormente, associados a um maior risco cardiovascular em pacientes com DM2 (Singh *et al.*, 2013). Por isso, em 2008 a *Food*

and Drugs determinou que todo novo medicamento para DM2 tivesse um benefício cardiovascular como pré-requisito, e assim surgiram os inibidores do co-transportador de sódio-glicose do tipo 2 (SGLT2) (Yoon *et al.*, 2011).

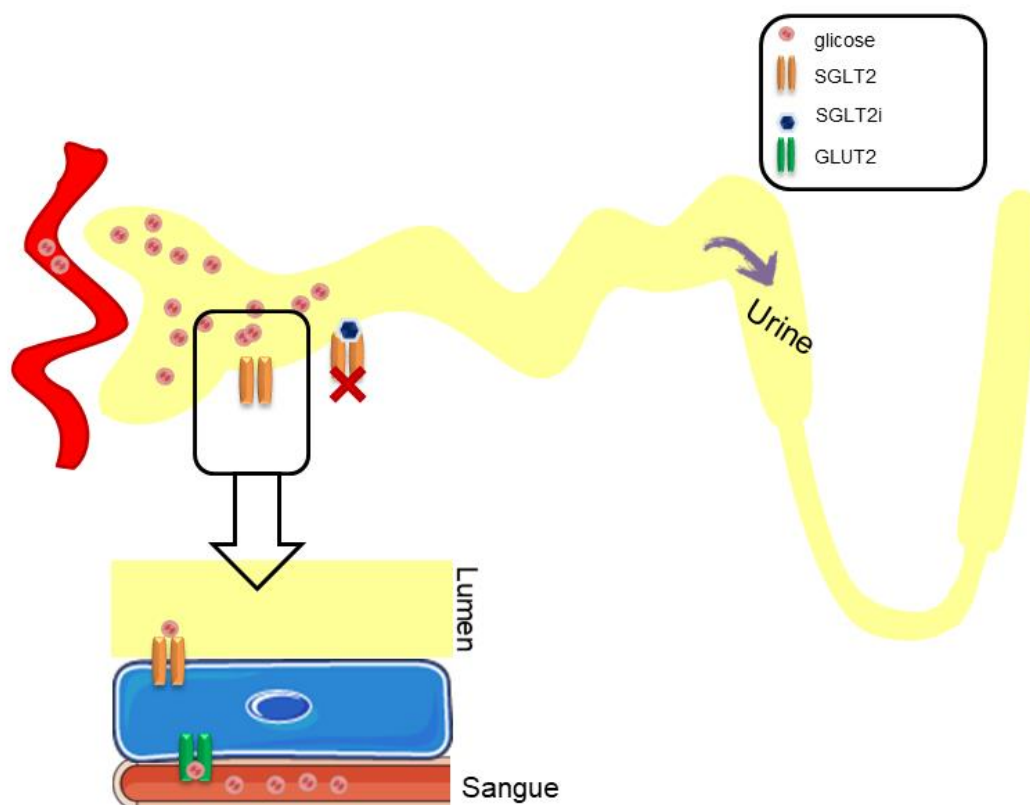
Essa classe de medicamentos age inibindo a reabsorção da glicose nos rins e assim, diminuem a hiperglicemia, com ação independente da insulina. Cerca de 90% da filtração de glicose nos glomérulos é reabsorvida no túbulo contorcido proximal através dos SGLT2, os outros 10% são reabsorvidos na parte distal pelos SGLT1. Os SGLTs são proteínas localizadas na membrana apical e são capazes de transportar glicose junto com o sódio contra a concentração de gradiente da célula (Lee e Han, 2007).

Esse mecanismo é controlado por uma bomba de sódio-potássio dependente de adenosina trifosfato (ATP). Uma vez no espaço intracelular, a glicose passa por difusão passiva para a membrana basolateral chegando à corrente sanguínea por um transportador de glicose do tipo 2 (GLUT2). Se a glicose sanguínea excede a excreção de glicose do túbulo renal em 180mg/dL, ocorre o fenômeno de glicosúria (Pancholia, 2018), Figura 6.

As propriedades farmacocinéticas favoráveis dos inibidores do SGLT2 são sua excelente biodisponibilidade oral, meia-vida de eliminação bastante longa, que permite uma única administração diária, índice de acúmulo reduzido, ausência de metabólitos ativos, excreção renal limitada e baixo risco de interação com outros fármacos (Scheen, 2015).

Vários inibidores do SGLT2 são comercializados em todo o mundo, como a dapagliflozina, canagliflozina e empagliflozina, ipragliflozina, luseogliflozina e tofogliflozina. Também são relevantes a ertugliflozina e a remogliflozina, entre outras, que já estão na fase tardia do desenvolvimento (Scheen, 2015). Eles podem ser usados em monoterapia em pacientes tratados com dieta ou combinados com qualquer outro agente anti-glicêmico (Scheen, 2015).

Figura 6: Mecanismo de absorção da glicose e ação dos inibidores do SGLT2



Legenda: A glicose passa do lúmen renal para as células através do SGLT2, para chegar ao sangue a glicose utiliza o transportador GLUT2. Os inibidores do SGLT2 inibem esse processo, diminuindo a absorção de glicose e, então, a hiperglicemia.

Fonte: Adaptado de Petito-da-Silva (2019)

Esses medicamentos foram desenvolvidos baseados na estrutura da Florizina que é um inibidor de SGLT1 e SGLT2 natural (White, 2015), encontrado na raiz da casca, folhas, brotos e frutos da macieira, com alta afinidade pelo SGLT2 (Hummel *et al.*, 2011), e tem sido usado por mais de 100-150 anos para induzir glicosúria (Chasis *et al.*, 1933).

Os inibidores do SGLT2 documentaram um bom perfil de segurança, com baixo risco de hipoglicemia, devido ao seu efeito glicose dependente (Pancholia, 2018), e alto risco de infecções do trato urinário e de órgãos genitais, provavelmente devido ao aumento urinário (Scheen, 2015).

A proteção renal por inibidores de SGLT2 depende basicamente da modulação do *feedback* túbulo-glomerular (Kuriyama, 2019). Uma das principais causas que progride na nefropatia diabética é a hiperfiltração glomerular. O aumento na entrega de sódio à mácula densa, causada pela inibição do SGLT2, aumenta o *feedback* túbulo-glomerular, levando à vasoconstrição arteriolar aferente, reduzindo assim a

pressão intraglomerular, resultando em diminuição da hiperfiltração e preservação renal (Steven *et al.*, 2017).

Embora o SGLT2 não seja facilmente detectado no coração (Di Franco *et al.*, 2017), o SGLT1 parece ter grande expressão no coração de humanos, ratos e camundongos, sendo regulada em diabetes e insuficiência cardíaca (Uthman *et al.*, 2018). A associação entre a quantidade/função de expressão de SGLT1 e a inibição de SGLT2 não estão estabelecidas; mesmo se considerados de alta relevância na fisiopatogenia da CMD e insuficiência cardíaca (Kaplan *et al.*, 2018). Nos rins, a inibição do SGLT2 aumenta a reabsorção feita pelo SGLT1, o que pode ter um efeito direto na mudança no metabolismo do miocárdio, através de uma resposta humoral que aumenta a quantidade de SGLT1 no coração (Pancholia, 2018).

Como os inibidores do SGLT2 agem no coração ainda é pouco sabido. Um dos mecanismos propostos, além da hipoglicemia, consiste na mudança de combustível cardíaco de AG à cetonas, controlando adipocinas pré e pós inflamatórias pela inibição do trocador de sódio e hidrogênio do tipo 3 (NH3) (Lahnwong *et al.*, 2018).

1.5.1 Empagliflozina

A empagliflozina, o inibidor do SGLT2 com maior seletividade comparado ao SGLT1 (>2500 vezes), está disponível no mercado com o nome fantasia *Jardiance* em doses de 10mg e 25mg, e possui entre 90 e 97% de biodisponibilidade, e uma meia vida em torno de 13h (Shubbrook *et al.*, 2015).

Seus efeitos colaterais mais relatados foram infecções do trato urinário, infecções micóticas genitais e dislipidemia. Devido às suas propriedades diuréticas relacionadas à depleção de volume, desidratação, hipotensão, hipovolemia e síncope também foram relatadas. A *Food And Drugs Administration* emitiu um alerta para a Gangrena de *Fournier*, um tipo de fascíte necrosante do períneo. Foram registrados doze casos e todos os doze foram hospitalizados, necessitando de desbridamento cirúrgico (Fitchett *et al.*, 2019; Schwaiger *et al.*, 2019).

Nos pacientes com DM2, a excreção urinária de glicose aumenta aproximadamente 64g por dia com 10 mg de empagliflozina e 78 gramas por dia com 25 mg. A empagliflozina reduz a carga de sódio e volume, causando contração intravascular através de suas propriedades diuréticas e natriuréticas (Home, 2019).

O EMPA-REG OUTCOME, um estudo com 7020 indivíduos, avaliou os efeitos renais e cardiovasculares a longo prazo da empagliflozina em pacientes com DM2, alto risco cardiovascular e taxa de filtração glomerular ≥ 30 ml/min (Zinman *et al.*, 2015). Neste estudo, juntamente com a empagliflozina, cerca de 80% dos pacientes foram tratados com um inibidor da ECA ou com antagonista do receptor AT1 como parte de seu tratamento padrão. O estudo constatou que a empagliflozina reduziu a taxa de incidentes ou piora da nefropatia, com uma redução relativa do risco de 39%. O tratamento com empagliflozina também reduziu o risco de morte por DCV, hospitalização por insuficiência cardíaca e morte por qualquer causa, com reduções de risco relativo de 38%, 35% e 32%, respectivamente, mas não alterou o risco de IM não fatal ou AVC não fatal (Zinman *et al.*, 2015).

Uma explicação possível para o efeito protetor cardíaco e renal da inibição do SGLT2 são os efeitos pleiotrópicos associados; isto é, a indução de múltiplos processos que têm uma influência benéfica sinérgica nos sistemas renal e cardiovascular (Vallon e Thomson, 2017).

A inibição de SGLT2 atenua a hiper-reabsorção tubular proximal primária nos rins no diabetes, aumentando o sinal de *feedback* túbulo-glomerular na mácula densa (Steven *et al.*, 2017) e pressão hidrostática no espaço de *Bowman*. Isso reduz a hiperfiltração glomerular, afetando benéficamente a filtração da albumina e o trabalho de transporte tubular (Vallon e Thomson, 2017).

Pela inibição da reabsorção de sódio e glicose ocorre uma diurese osmótica que contribui para a diminuição da pré carga, do estiramento ventricular e de arritmias. Essa diurese osmótica também contribui para diminuição na rigidez arterial, no peso e nas concentrações séricas de ácido úrico, além de reduzir a pressão sistólica e diastólica (Vallon e Thomson, 2017; Zhao *et al.*, 2018; Filippatos *et al.*, 2019) e aumentar a excreção de creatinina (Cherney *et al.*, 2014b). A diminuição no peso corporal contribui para redução da pressão arterial e de massa gorda que atinge o coração, diminuindo a morbidade cardiovascular por diminuição de inflamação, fibrose e arritmias (Poirier *et al.*, 2006).

Existe um aumento na atividade do SRA devido à contração do volume plasmático. No entanto, foi sugerido uma atuação através das vias não clássicas do SRA. Já foi observada a ativação da via da Ang(1-7) levando a vasodilatação, efeitos anti-inflamatórios e efeitos inotrópicos positivos (Filippatos *et al.*, 2019).

Em cultura de células, a empagliflozina mostrou ter um efeito positivo na diminuição na fibrose e em marcadores de inflamação renal (Panchapakesan *et al.*, 2013). Estudos experimentais com camundongos obesos e diabéticos demonstraram um efeito da empagliflozina reduzindo a hipertrofia glomerular (Gembardt *et al.*, 2014) e melhorando a fibrose cardíaca, espessamento da artéria coronária e infiltração de macrófagos, sugerindo um efeito cardíaco direto na atenuação do estresse oxidativo no miocárdio (Lin *et al.*, 2014). Também já foi relatado sua relação diminuindo a esteatose cardíaca junto com a diminuição da expressão de transportadores de lipídeos no coração (Aragon-Herrera *et al.*, 2019), e a mudança metabólica cardíaca na oxidação de lipídeos (Lee *et al.*, 2019).

Além disso, Verma e colaboradores reportou o uso de empagliflozina em uma dose de 10mg/dia durante 3 meses diminuindo a massa do VE e melhorando a função diastólica em humanos (Verma *et al.*, 2016), os mesmos resultados foram encontrados por Li e colaboradores em um tratamento com a mesma dose por 8 semanas em camundongos (Li *et al.*, 2019). Em camundongos db/db, um tratamento de 10 semanas diminuiu a infiltração de macrófagos no interstício cardíaco, o estresse oxidativo tanto cardíaco quanto arterial e melhorou a fibrose cardíaca, arterial (Lin *et al.*, 2014) e renal (Gallo *et al.*, 2016), a melhora arterial também já foi observada com 8 semanas de tratamento (Cherney *et al.*, 2014a). Jigheh e colaboradores relataram que um tratamento de 4 semanas com uma dose de 10mg/dia diminui a inflamação, estresse oxidativo e apoptose renal em ratos *Wistar* diabéticos (Ashrafi Jigheh *et al.*, 2019). Kusaka e colaboradores também já mostraram a empagliflozina melhorando estresse oxidativo, massa do VE, tamanho dos cardiomiócitos e fibrose (Kusaka *et al.*, 2016).

Em duas doses testadas, 10 mg/kg/dia e 30 mg/kg/dia, a empagliflozina demonstrou melhorar as relações de volume médio de pressão e contratilidade ventricular, além de aliviar as alterações histopatológicas e a apoptose dos cardiomiócitos induzida por ERE, regulando as proteínas CHOP, Caspase-12, GRP-78 (*Glucose-regulated protein-78*) e TRAF2 (*TNF Receptor Associated Factor 2*) em modelo de CMD induzida por estreptozotocina (Zhou e Wu, 2017). Em níveis moleculares, a empagliflozina já foi relatada aumentando a expressão de *Sod2* (Mizuno *et al.*, 2018; Ashrafi Jigheh *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019) e Catalase (Mizuno *et al.*, 2018) e diminuindo *Timp-2* (Ashrafi Jigheh *et al.*, 2020), *Nox1*, *Nox2* (Oelze *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2019) e *Nox4* (Li *et al.*, 2019).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da Empagliflozina no coração de camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta hiperlipídica.

2.2 Objetivos específicos

- Induzir alterações metabólicas através de dieta hiperlipídica e posteriormente tratar com empagliflozina
- Avaliar a ingestão alimentar, massa corporal e pressão arterial
- Realizar análises bioquímicas plasmáticas e urinárias
- Analisar a morfologia cardíaca e a quantificação estereológica
- Avaliar as vias do SRA, estresse oxidativo e ERE do coração através de expressão gênica

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e dietas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA 031/2017), e os procedimentos ocorreram de acordo com as diretrizes de experimentação animal (NIH *Publication* No, 85-23, revisada em 1996). Foram utilizados camundongos machos da cepa C57BL/6 com três meses de idade mantidos em micro-isoladores em prateleiras ventiladas (Sistema Nexgen, Allentown Inc., PA, EUA) e sob condições controladas de temperatura ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (60%). Foi utilizado o ciclo claro-escuro de 12/12h e livre acesso a água e comida.

O experimento utilizou 40 animais, que, ao início do experimento, foram divididos aleatoriamente em dois grupos ($n=20/\text{grupo}$) que receberam diferentes dietas durante as primeiras 10 semanas de experimento: dieta controle (C; 10% da energia provinda de lipídeos) e dieta rica em gordura (*high-fat diet*, HF; 50% da energia provinda de lipídeos). As dietas foram fornecidas pela Prag Soluções (Jau, Brasil). O conteúdo mineral e vitamínico das dietas foi idêntico obedecendo as diretrizes da *American Institute of Nutrition* de manutenção (AIN-93M) (Reeves *et al.*, 1993) (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição das dietas

Nutrientes	Dietas	
	C	HF
Caseína ($\geq$ proteína 85%) (g)	140,0	175,0
Amido de milho (g)	620,7	347,7
Sacarose (g)	100,0	100,0
Banha de porco (g)	---	238,0
Óleo de soja (g)	40,0	40,0
Fibras (g)	50,0	50,0
Mix de vitaminas (g)	10,0	10,0
Mix de minerais (g)	35,0	35,0
Antioxidante (g)	0,008	0,060
Total (g)	1000	1000
Energia (Kcal)	3802,8	5000
Carboidrato (% energia)	76	36
Proteínas (% energia)	14	14
Lipídios (% energia)	10	50

Após as 10 semanas iniciais, os animais foram novamente divididos. Nos grupos C e HF foram selecionados aleatoriamente 10 animais para receber o tratamento com Empagliflozina (*Jardiance*, *Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals*, 10mg/kg/dia adicionada à dieta) durante 5 semanas, formando quatro grupos (n=10/grupo):

- Grupo controle – **C**; não tratado, alimentado com dieta controle;
- Controle + Empagliflozina – **CE**; tratado com Empagliflozina, alimentado com dieta controle;

- c. Grupo hiperlipídico – **HF**; não tratado, alimentado com dieta HF;
- d. Grupo hiperlipídico + Empagliflozina – **HFE**; tratado com Empagliflozina, alimentado com dieta HF.

3.2 Ingestão alimentar e hídrica e massa corporal

As ingestões alimentar e hídrica foram avaliadas diariamente, e foi calculado a diferença entre a quantidade de alimento e água oferecidos e a quantidade restante após 24h. Os resultados foram apresentados em grama (g) e mililitros (mL), respectivamente. A massa corporal (MC) foi avaliada uma vez por semana em uma balança de precisão (modelo B320H, Shimadzu, Brasil).

3.3 Glicose urinária

Ao final das 15 semanas experimentais, os animais foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas e climatizados pelo período de 24h. Nas 24h seguintes, a urina foi coletada e posteriormente armazenada a -20°C até ao momento da análise. A glicose urinária foi detectada com tiras reagentes de glicose (Alamar, SP, Brasil).

3.4 Ácido Úrico (urinário e plasmático)

Para análise do ácido úrico urinário, utilizou-se uma alíquota de urina de 25 µl como volume final, com diluição de 1:10 em água para a determinação enzimática do ácido úrico por método colorimétrico enzimático utilizando um espectrofotômetro automatizado e kit comercial. A intensidade da cor de tonalidade cereja formada é diretamente proporcional à concentração de ácido úrico na amostra (Sistema Bioclin II, Quibasa Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil). De modo semelhante foi realizada a análise do ácido úrico plasmático, utilizando 25 µl de plasma coletado por punção cardíaca no momento do sacrifício. Foi utilizado heparina para evitar coagulação.

3.5 Teste Oral de Tolerância à Glicose e Glicose (TOTG)

O TOTG foi realizado após as primeiras 10 semanas de experimento e antes da eutanásia. Os animais permaneceram em jejum por 6h e então receberam 1g de glicose/kg através de gavagem orogástrica (25% em solução salina estéril, 0,9%NaCl). Em seguida, o sangue foi coletado da veia da cauda através de um glicosímetro (Accu-chek, Roche Diagnostics) nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos. A comparação entre grupos baseou-se na área sob a curva (versão Prism 8,0 para Windows; Software GraphPad, La Jolla CA, EUA). O tempo 0 foi considerado a glicemia de jejum.

3.6 Análise da Insulina Plasmática e HOMA-IR

A concentração plasmática de insulina foi avaliada por ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática) utilizando um kit comercial (Cat, #EZRMI-13K, Milipore, Missouri, EUA) com o equipamento TP Reader Termoplate (Tek Instruments Inc. Highland Park, EUA). Para o cálculo do HOMA-IR (índice HOMA para avaliação da resistência à insulina), foi utilizada a fórmula:

$$\frac{I \times G}{22,5} \quad (1)$$

onde I é a insulina em jejum ($\mu\text{U/mL}$), e G é a glicemia em jejum (mg/dL) (Katz *et al.*, 2000).

3.7 Pressão arterial sistólica

Os animais foram ambientados durante 2 semanas, pré experimentais, para minimizar o estresse da manipulação e do tempo de permanência no equipamento. Após esse período, uma vez por semana, durante todo o experimento, os animais foram mantidos aquecidos utilizando uma plataforma de aquecimento e a pressão foi

aferida pelo método não-invasivo da pletismografia caudal (Insight, Ribeirao Preto, SP, Brazil). Utilizou-se a média de 3 aferições por animal para a medida da PA sistólica final.

3.8 Morte dos animais

Após quinze semanas de experimento, os animais jejuaram durante a noite por 6h e foram anestesiados com Ketamina (240 mg/kg) e Xilazina (30 mg/kg) por via intraperitoneal. O sangue foi coletado por punção cardíaca e centrifugado em temperatura ambiente para obter plasma (120xg por 15 min). Foi utilizado heparina para evitar coagulação. O plasma obtido foi armazenado individualmente a -80°C para futuras análises.

3.9 Bioquímica plasmática

Colesterol total e TG plasmáticos foram quantificados pelo método colorimétrico enzimático, utilizando um espectrofotômetro automático e kits comerciais (BioclinSystem II, Quibasa Ltda. Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.10 Estereologia e morfometria do VE

O coração foi dissecado e pesado pelo método de Scherle, assim como o VE. O comprimento da tíbia esquerda foi medido para normalizar a massa do VE (Yin *et al.*, 1982). Algumas amostras do VE foram fixadas por 48 horas (formaldeído a 4% w/v, 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2), outras foram armazenadas a -80°C para análises moleculares.

Os fragmentos antes fixados, foram incorporados a *Paraplast Plus* (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, EUA), e seccionados em uma espessura de 5µm. Coração foi corado com Hematoxilina-Eosina. Imagens digitais foram tiradas com um microscópio BX51 (Olympus, Tóquio; Japão) e uma câmera *Infinity 1-5c* (Lumenera, Ottawa, Canadá). A espessura do VE foi medida na borda livre com auxílio do software *Image*

Pro Plus v. 7.01 para Windows (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Foram realizadas 3 medições e a média entre elas foi considerada como resultado final.

Foi aplicada uma análise estereológica para estimativa da área seccional média dos cardiomiócitos, simbolizada pela sigla ($A[car]$). Para isso, foi obtido, cinquenta campos longitudinais aleatórios para cada grupo e foi utilizada a viodeomicroscopia para análise dos cortes, utilizando um sistema teste composto por uma área teste conhecida (AT) com 36 pontos. A AT possui duas linhas proibidas e as estruturas que as tocavam não eram contadas para evitar uma super estimação. A densidade de volume de cardiomiócitos ($Vv[car]$) foi estimada por contagem de pontos para isso foi utilizada a seguinte fórmula:

$$Vv = Pp / Pt \quad (2)$$

onde Pp (pontos parciais) é o número de pontos que tocam os cardiomiócitos/glomérulos e Pt (pontos totais) é o número total de pontos na área teste (=36).

A área seccional média, ($A[car]$), foi realizada para caracterizar a hipertrofia dos cardiomiócitos e estimada como:

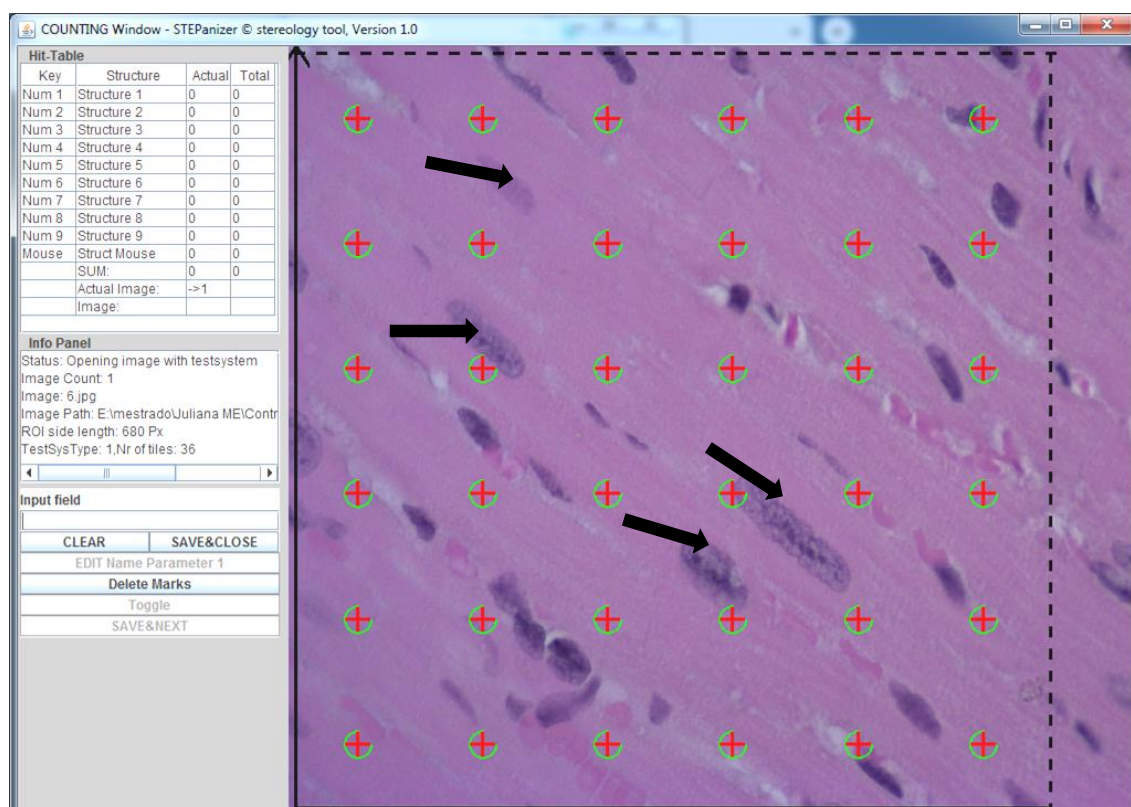
$$A[car] = Vv[car] / 2 \times Qa \quad (3)$$

Onde

$$Qa[car] = N[car] / AT \quad (4)$$

sendo N o número de núcleos de cardiomiócitos contados na AT, considerando a linha proibida e suas extensões (Mandarim-de-Lacerda, 2003). A figura 7 ilustra o teste descrito. Todas as análises de estereologia e morfometria foram cegas para que não houvesse interferência dos resultados.

Figura 7: Área teste com a grade de 36 pontos



Legenda: Área teste gerada pelo programa *stepanizer*. As linhas pontilhadas foram consideradas linhas proibidas e qualquer núcleo de cardiomiócito que tocasse nelas não foi considerado. As setas indicam núcleos de cardiomiócitos, corados com hematoxilina e eosina.

Fonte: O autor

3.11 Dosagem de hidroxiprolina

A parte mais apical dos VEs retirados no momento do sacrifício e fixados em formaldeído, não foi utilizada para os métodos de coloração, sob uma lupa foram dissecados retirando uma fina camada de tecido de toda a superfície luminal e da parede externa para remover o colágeno do tecido conjuntivo subendocárdico e membranas pericárdicas.

O VE obtido foi cortado em partes menores e lavado em água destilada por três vezes de 30 minutos cada, imerso em acetona por 24h e submetido a duas trocas de 24h cada em 40mL de clorofórmio:metanol (2:1) à temperatura ambiente. O solvente foi decantado e após incubação a 60°C por 30 minutos, foi obtida uma preparação de

tecido miocárdico seco e desengordurado. Esse tecido foi pesado obtendo cerca de 4-8mg/amostra. Cada amostra preparação foi hidrolisada em 1mL de HCl por 18h a 118°C (Cabral *et al.*, 2003) e a concentração de colágeno total foi então determinada por um ensaio colorimétrico de hidroxiprolina (Bergman e Loxley, 1969) utilizando trans-4-hidroxi-L-prolina (Sigma-Aldrich, H54409) como padrão. Os resultados foram expressos em microgramas de hidroxiprolina por miligrama de tecido seco e sem gordura.

3.12 RT-qPCR (Transcriptase reversa-PCR quantitativo)

O RT-qPCR foi realizado para detectar a expressão de mRNA de genes relacionados ao estresse oxidativo, ERE e SRA. O RNA total do coração foi extraído usando Trizol (Invitrogen, CA, EUA). A concentração de mRNA foi determinada por espectroscopia usando o equipamento NanoVue (GE Life Sciences), 1µg de RNA foi aliquoteado e a DNAase (Invitrogen) foi adicionado. O cDNA foi sintetizado utilizando iniciadores Oligo (dT) e transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen, CA, EUA). O PCR foi realizado usando o termociclador Biorad CFX96 e SYBR Green (Invitrogen, CA, EUA). O gene da β -actina foi usado como um controle endógeno para corrigir a expressão dos genes alvo. A eficiência da corrida dos genes alvo e do gene endógeno foi aproximadamente igual, sendo calculada por diluições seriadas do cDNA. As reações de PCR foram realizadas seguindo um programa de desnaturação e ativação da polimerase (4 min a 95°C), com 44 ciclos, cada qual consistindo de 95°C por 10s e 60°C por 15s, seguido por uma curva de fusão (60-95°C, com uma taxa de aquecimento de 0,1°C/s). Os controles negativos consistiram em que o cDNA foi substituído por água desionizada. A relação de expressão relativa de mRNA foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde CT expressa a diferença entre o número de ciclos dos genes alvo e o controle endógeno.

Os primers foram projetados usando o software on-line Primer3 web versão 4,0,0. Sequências de primers sentido e antisentido utilizadas para amplificação são descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Primers utilizados nas análises de RT-qPCR

Primers	(5'–3')	Sequências
<i>β actina</i>	Forward	TGTTACCAACTGGGACGACA
<i>β actina</i>	Reverse	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA
<i>Plin2</i>	Forward	AATATGCACAGTGCCAACCA
<i>Plin2</i>	Reverse	CGATGCTTCTCTTCCACTCC
<i>Renina</i>	Forward	ACCTTGCTTGTGGGATTAC
<i>Renina</i>	Reverse	CCTGATCCGTAAGTGGATGGT
<i>Eca</i>	Forward	GTGGCTGGAAGAGCAGAATC
<i>Eca</i>	Reverse	GCCTTGGCTTCATCAGTCTC
<i>Eca2</i>	Forward	CAACAGAAGCCAGACAACA
<i>Eca2</i>	Reverse	GCCTTGGCTTCATCAGTCTC
<i>At1r</i>	Forward	CCCTGGCTGACTTATGCTTT
<i>At1r</i>	Reverse	ACATAGGTGATTGCCGAAGG
<i>At2r</i>	Forward	GAAGCTCCGCAGTGTGTTTA
<i>At2r</i>	Reverse	TGGCTAGGCTGATTACATGC
<i>Masr</i>	Forward	TTCTCCACCATCAACAGCAG
<i>Masr</i>	Reverse	CCTGGGTTGCATTTTCATCTT
<i>Atf4</i>	Forward	CCGAGATGAGCTTCCTGAAC
<i>Aft4</i>	Reverse	ACCCATGAGGTTTCAAGTGC
<i>Chop</i>	Forward	CTGCCTTTCACCTTGGAGAC
<i>Chop</i>	Reverse	CGTTTCCTGGGGATGAGATA
<i>Gadd45</i>	Forward	GCGAGAACGACATCAACATC
<i>Gadd45</i>	Reverse	GTTCGTCACCAGCACACAGT
<i>Nox4</i>	Forward	TCTCAGGTGTGCATGTAGCC
<i>Nox4</i>	Reverse	TTGCTGCATTCAAGTTC
<i>Catalase</i>	Forward	TTGACAGAGAGCGGATTCT
<i>Catalase</i>	Reverse	TCTGGTGATATCGTGGGTGA
<i>Sod1</i>	Forward	TGGTGGTCCATGAGAAACAA
<i>Sod1</i>	Reverse	AATCCCAATCACTCCACAGG
<i>Sod2</i>	Forward	CAGGACCCATTGCAAGGAA
<i>Sod2</i>	Reverse	GTGCTCCACACGTCAATCC
<i>Timp1</i>	Forward	CACAGACAGCCTTCTGCAAC
<i>Timp1</i>	Reverse	CATTTCCACAGCCTTGAAT

3.13 Análise de dados

A distribuição normal e a homocedasticidade foram testadas quanto a diferenças nos dados quantitativos. Para analisar os dois grupos na fase pré-tratamento, foi usado o teste *T-Student*. Para análise dos quatro grupos durante o tratamento, adotou-se o teste ANOVA de um fator com correção de *Welch* e pós-teste de *Tamhane T2* (*Graph Pad Prism*, versão 8, CA, EUA). Também foi realizado o teste *Two-Way* ANOVA para verificar a influência dos diferentes fatores (dieta e tratamento) sobre os resultados encontrados. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

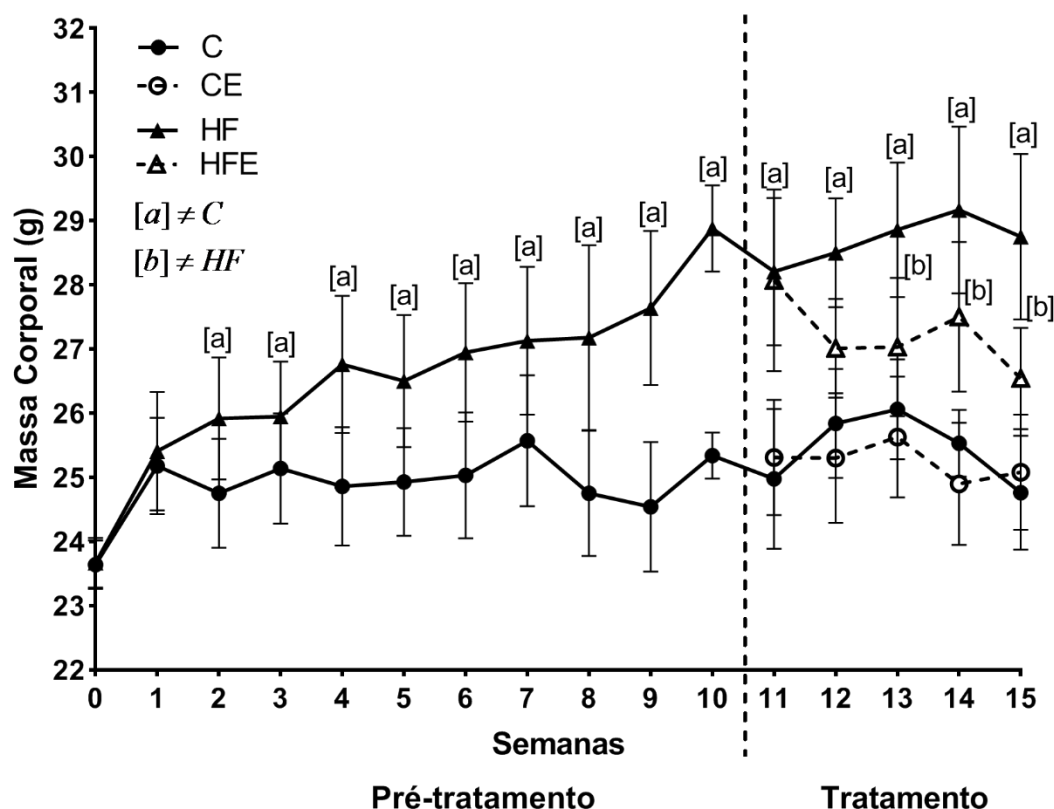
4.1 Massa corporal (MC)

Os grupos C e HF iniciaram o experimento sem diferenças na MC ($p=0,87$). A partir da segunda semana de experimento, o grupo HF apresentou maior MC quando comparado com o grupo C (+4%, $p<0,01$). Após as dez semanas de dieta hiperlipídica o grupo HF apresentou aumento significativo em sua MC em comparação ao grupo C (+14%, $p<0,01$).

O tratamento com empagliflozina apresentou ação na MC a partir da terceira semana, diminuindo a massa no grupo HFE em 5% ($p<0,01$) em comparação com o grupo HF. Essa diferença se manteve até a última semana de tratamento (-7%, $p<0,01$). Entre a MC dos grupos C e CE o tratamento com empagliflozina não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p=0,96$), figura 8.

A análise do *Two-Way* ANOVA mostrou que a dieta HF teve uma influência mais significativa sobre esses resultados, representando 58,86% ($p<0,01$) da variância total, enquanto o tratamento com empagliflozina foi responsável por 5,2% e a interação dieta-tratamento responsável por 10,01% da variância sobre MC.

Figura 8: Evolução na massa corporal.



Legenda: C– controle; CE- controle + empagliflozina; HF– *high fat diet*; HFE– *high fat diet* + empagliflozina. Análise estatística no período de pré-tratamento realizado teste *t-Student* e no período de tratamento utilizado teste ANOVA de um fator e pós-teste de *Tamhane T2* e considerando significativo $p < 0,05$. Diferenças apresentadas como: a≠C; b≠HF.

4.2 Ingestão alimentar

A ingestão alimentar iniciou sem diferença estatística entre o grupo HF e o grupo C, mas já na segunda semana de experimento, o grupo HF apresentou uma diminuição que seguiu até o final do período pré-tratamento (-14%, $p < 0,01$). Logo após a primeira semana de tratamento, o grupo HFE apresentou um aumento significativo na ingestão alimentar quando comparado a sua contraparte e permaneceu até o fim do tratamento (+17%, $p < 0,01$). Os grupos C e CE não apresentaram diferença durante todo o tratamento ($p = 0,3$), tabela 3.

O *Two-Way* ANOVA mostrou que a dieta HF corresponde a 26,74% da variância total com relação a esse parâmetro ($p < 0,01$).

4.3 Ingestão hídrica

Na primeira semana de experimento os grupos C e HF não apresentaram diferença na ingestão hídrica ($p=0,32$). Na 10ª semana de experimento, o grupo HF apresentou diminuição de 20% ($p<0,01$) comparado ao grupo C. Após o período de tratamento com empagliflozina, o grupo HFE mostrou um aumento de 33% na ingestão hídrica comparado ao grupo HF ($p<0,01$). O grupo CE não apresentou diferença significativa na ingestão hídrica quando comparado ao grupo C ($p=0,12$), tabela 3. Os resultados do *Two-Way* ANOVA indicam que existe uma influência maior do tratamento no aumento da ingestão hídrica (32,37%, $p<0,01$).

Tabela 3 - Ingestão alimentar e hídrica

Parâmetros	C	CE	HF	HFE
Ingestão alimentar (g)				
Pré tratamento	2,5±0,2		2,1±0,4 ^a	
Tratamento	2,5±0,2	2,5±0,1	2,1±0,3 ^a	2,4±0,3 ^b
Ingestão hídrica (ml)				
Pré tratamento	4,8±1,5		3,8±0,9 ^a	
Tratamento	4,8±0,6	5,4±0,6	3,7±0,4 ^a	5,0±0,7 ^b

Legenda: C– controle; CE- controle + empagliflozina; HF– *high fat diet*; HFE– *high fat diet* + empagliflozina. Análise estatística no período de pré-tratamento realizado teste *t-Student* e no período de tratamento utilizado teste ANOVA de um fator e pós-teste de *Tamhane* T2 e considerando significativo $p<0,05$. Diferenças apresentadas como: ^a≠C; ^b≠HF.

4.4 Volume urinário

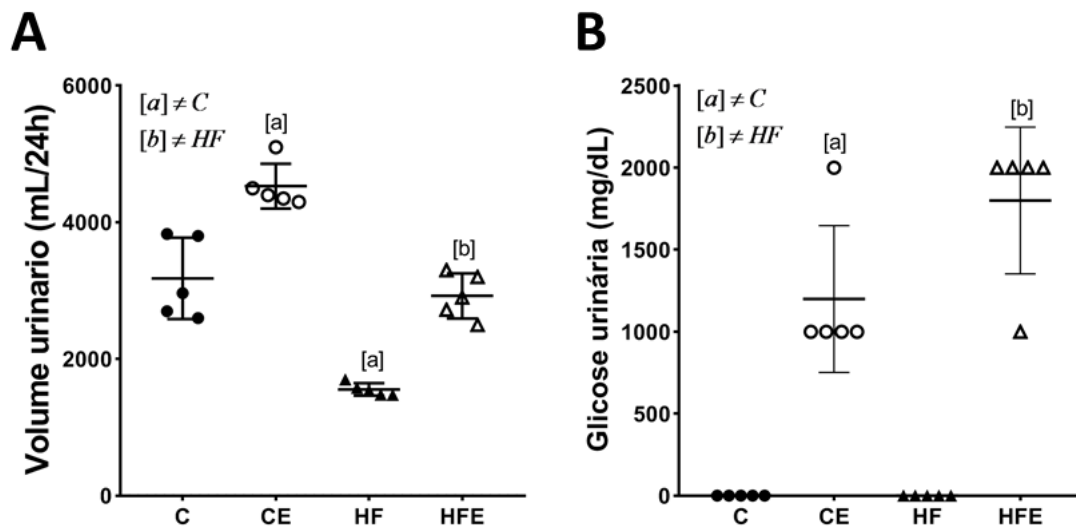
O tratamento com empagliflozina aumentou o volume urinário em ambos os grupos tratados, HFE (+88%, $p=0,002$) e CE (+42%, $p=0,02$) em comparação com suas contrapartes não tratadas, resultados na figura 9.

4.5 Glicose urinária

Quanto a presença de glicose na urina, não foi observada diferença entre os grupos C e HF ($p>0,99$). Por outro lado, nos grupos tratados foi observada diferença significativa, tanto no grupo CE quando no grupo HFE ($p<0,01$) comparados às suas contrapartes não tratadas, figura 9.

Os resultados da análise de Two-way revelam que há uma interação entre medicamento e dieta HF (30,73%, $p<0,01$) para que ocorra a diminuição na glicose urinária, contudo dieta (29%, $p<0,01$) e medicamento (21,1%, $p<0,01$) sozinhos também apresentaram porcentagem considerável na variância total desse resultado.

Figura 9: Volume urinário e glicose urinária



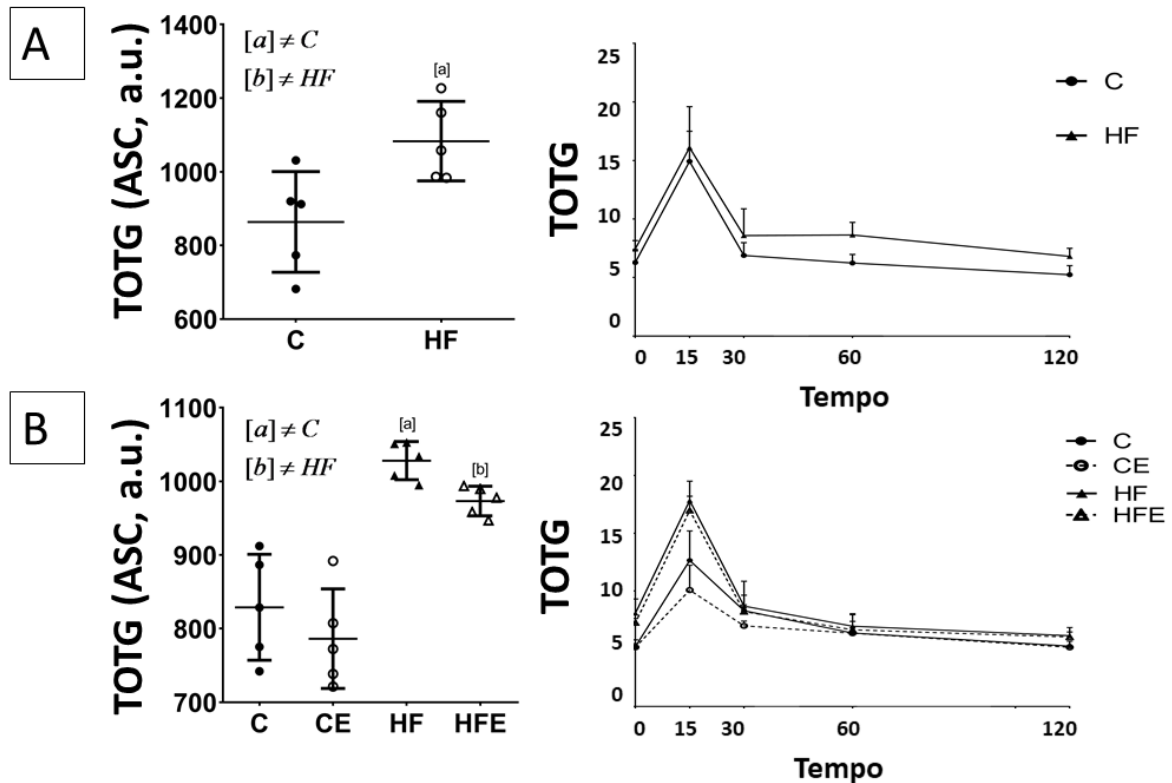
Legenda: **A**-Volume urinário. **B**- Glicose urinária. C- controle; CE- controle + empagliflozina; HF- *high fat diet*; HFE- *high fat diet* + empagliflozina. Análise estatística utilizando o teste ANOVA de um fator e pós-teste de *Tamhane* T2 e considerando significativo $p<0,05$. Diferenças apresentadas como: [a]≠C; [b]≠HF.

4.6 Teste de tolerância oral à glicose - TOTG

Ao final do período de pré-tratamento a análise da área sob a curva do grupo HF apresentou aumento significativo de 25% em comparação ao grupo C ($p<0,01$), demonstrando a presença de intolerância à glicose no grupo HF (Figura 9). Por outro lado, ao final do tratamento, a área sob a curva do grupo HFE apresentou uma diminuição de 5% quando comparada ao grupo HF ($p=0,03$), mostrando um efeito benéfico do tratamento com empagliflozina nesse grupo. Porém entre os grupos C e CE não foi encontrada diferença na área sob a curva do TOTG ($p=0,93$), figura 10.

A análise do *Two-way* ANOVA, mostrou que a dieta HF exerceu uma influência significativa sobre a análise da área sob a curva do TOTG, tendo uma influência de 77,06% na variância total desse resultado ($p<0,01$).

Figura 10: Teste Oral de Tolerância a Glicose (pré e pós tratamento).



Legenda: Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG). **A-** TOTG e Área Sob a Curva (ASC) referente ao pré tratamento. **B-** TOTG e Área Sob a Curva (ASC) referente ao pós tratamento. C- controle; CE- controle + empagliflozina; HF- *high-fat diet*; HFE- *high-fat diet* + empagliflozina. Análise estatística utilizando o teste ANOVA de um fator e pós-teste de *Tamhane* T2 e considerando significativo $p < 0,05$. Diferenças apresentadas como: [a]≠C; [b]≠HF.

4.7 Glicemia de jejum

O valor do tempo zero do TOTG foi considerado referente a glicemia de jejum. Assim, o grupo HF apresentou aumento significativo na glicemia de jejum em comparação ao grupo C (+78%, $p < 0,01$). O tratamento não mostrou diferença na glicemia dos grupos C e CE ($p = 0,98$), no entanto, entre os grupos HF e HFE, que já apresentavam alteração prévia neste parâmetro, houve uma diminuição significativa no grupo HFE (-23%, $p = 0,02$), figura 11.

O *Two-way* ANOVA revelou que a maior influência na variância desses resultados é proveniente da dieta HF (70,74%, $p<0,01$) e o tratamento com empagliflozina (10,91%, $p<0,01$).

4.8 Insulina plasmática

A insulina plasmática apresentou um aumento de 108% no grupo HF quando comparado ao C ($p<0,01$). Já o grupo HFE apresentou uma diminuição de 56% quando comparado a sua contraparte não tratada ($p=0,01$). Entre os grupos C e CE, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p=0,98$), figura 11.

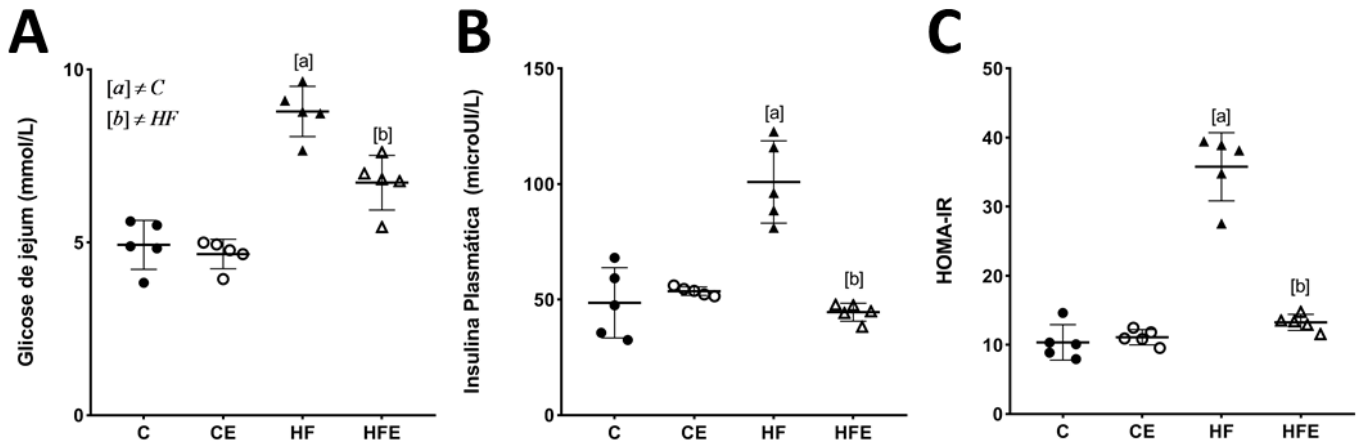
Segundo o *Two-way* ANOVA, a interação entre dieta-tratamento exerceu uma influência mais significativa sob esse parâmetro, uma vez que representou 37,39% da variância total ($p<0,01$), enquanto tratamento influenciou a variância total em 26,12% ($p<0,01$) e dieta HF influenciou em 18,51% ($p<0,01$).

4.9 HOMA-IR

Corroborando com os resultados da glicemia de jejum e insulina plasmática, o índice HOMA-IR indica a resistência à insulina desenvolvida pelo grupo HF e sua melhora no grupo HFE, com o tratamento com empagliflozina. O grupo HF apresentou aumento significativo no índice HOMA-IR de 245% quando comparado ao grupo C ($p<0,01$). Porém, o grupo HFE apresentou uma diminuição significativa de 73% no HOMA-IR quando comparado ao seu homólogo ($p<0,01$), ficando equiparado ao grupo C ($p=0,34$), evidenciando melhora na resistência à insulina. Entre os grupos C e CE não houve diferença ($p=0,99$), figura 11.

A análise do *Two-way* ANOVA revelou que a interação entre dieta-tratamento apresentou influência sobre a variância total do índice HOMA-IR ($p<0,01$). Contudo, a dieta HF foi o fator de maior influência, contribuindo com 40,26% da variância total.

Figura 11: Glicemia de jejum, Insulina plasmática e HOMA-IR.



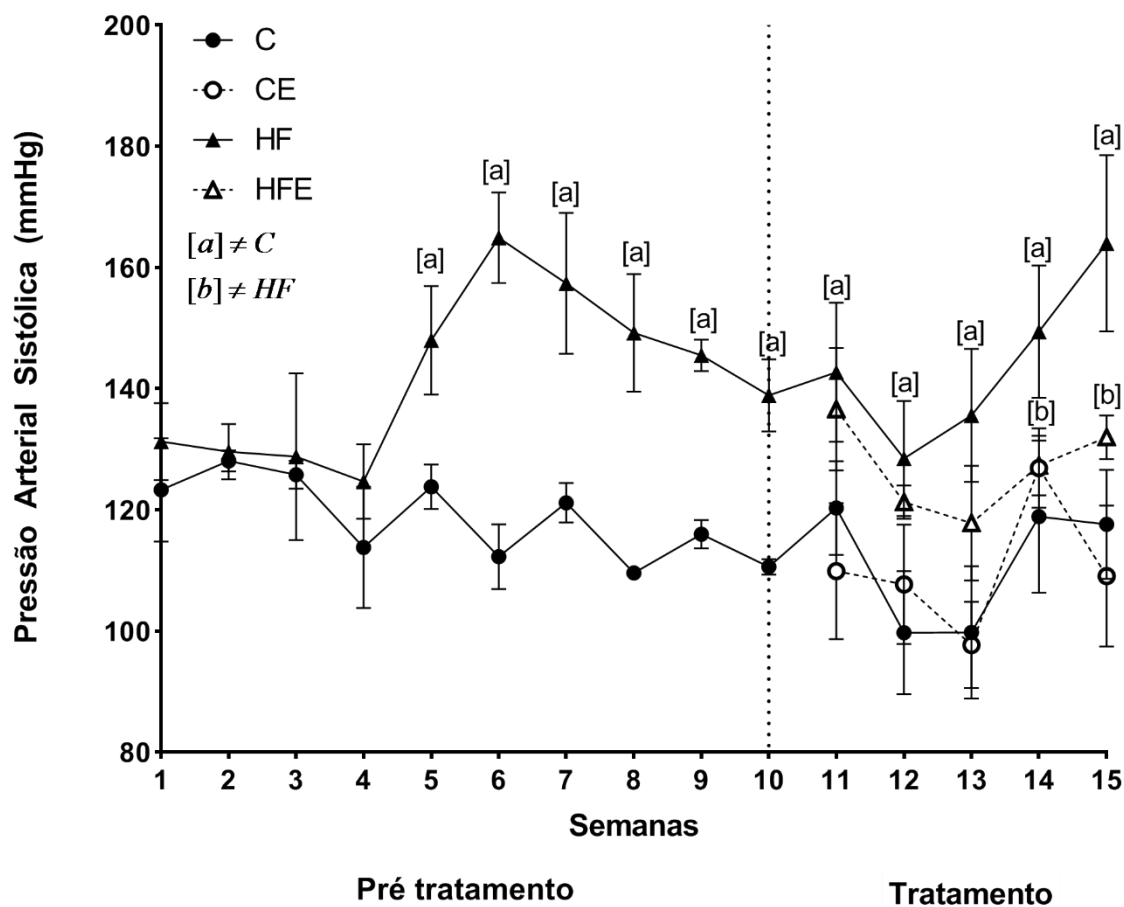
Legenda: **A-** Glicemia de jejum (mmol/L). **B-** Insulina Plasmática (microU/L). **C-** HOMA-IR. C– controle; CE– controle + empagliflozina; HF– *high-fat diet*; HFE– *high-fat diet* + empagliflozina. Análise estatística utilizando o teste ANOVA de um fator e pós-teste de *Tamhane T2* e considerando significativo $p < 0,05$. Diferenças apresentadas como: [a] ≠ C; [b] ≠ HF

4.10 Pressão Arterial Sistólica

Os grupos C e HF começaram o experimento sem diferença entre a PA ($p=0,13$). Na quinta semana de experimento, o grupo HF apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo C (+21% $p < 0,01$), até o final da fase do pré tratamento essa diferença foi mantida, (+25%, $p < 0,01$). Ao final do tratamento com empagliflozina, o grupo HFE apresentou uma diminuição significativa de 15% na PA ($p=0,04$) quando comparado a sua contraparte. O grupo CE não apresentou diferença de sua contraparte durante todo o tratamento ($p=0,79$), figura 12.

Segundo a análise do *Two-way ANOVA* a dieta HF foi responsável pela maior variância na PA (57,13%, $p < 0,01$), seguida pelo tratamento com empagliflozina (19,51%, $p < 0,01$).

Figura 12: Evolução da Pressão Arterial Sistólica.



Legenda: Pressão arterial sistólica, pré e durante o tratamento. C– controle; CE- controle + empagliflozina; HF– *high-fat diet*; HFE– *high-fat diet* + empagliflozina. Análise estatística no período de pré-tratamento realizado teste *t-Student* e no período de tratamento utilizado teste ANOVA de um fator e pós-teste de *Tamhane T2* e considerando significativo $p < 0,05$. Diferenças apresentadas como: $a \neq C$; $b \neq HF$

4.11 Bioquímica plasmática

4.11.1 Triglicerídeos

O grupo HF apresentou um aumento significativo de 13% comparado ao grupo C ($p < 0,01$), contudo, o grupo HFE não mostrou diferença significativa da sua contraparte ($p = 0,98$), tabela 4.

Segundo o *Two-way* ANOVA, a dieta HF parece ser o fator com maior influência sobre esse resultado (62,43%).

4.11.2 Colesterol total

As concentrações do colesterol plasmático foram maiores no grupo HF em comparação ao grupo C (+13%, $p<0,01$), porém o grupo HFE teve uma diminuição de 19% quando comparado ao grupo HF ($p<0,01$). O grupo CE não mostrou diferença com seu homólogo ($p=0,66$), como demonstrado na tabela 4.

Pelos resultados do *Two-way* ANOVA, apenas tratamento e a interação dieta-tratamento possuem influência sobre a variância total da concentração de colesterol plasmático ($p<0,01$). Contudo, a interação dieta-tratamento é a maior responsável por essa variância (54,9%).

4.12 **Ácido úrico**

4.12.1 Ácido úrico plasmático

O ácido úrico plasmático apresentou resultados contrários ao ácido úrico urinário, já que uma maior excreção do ácido úrico é responsável pela diminuição de sua concentração plasmática. Sendo assim, o grupo HF aumentou em 24% sua concentração plasmática ($p=0,01$), enquanto o grupo HFE diminuiu 17% ($p=0,02$), ambos comparados a suas contrapartes, C e HF, respectivamente, tabela 4.

O resultado da análise do *Two-way* ANOVA mostrou que o fator responsável por maior influência nessa variância foi a interação dieta-tratamento (48,75%, $p<0,01$).

4.12.2 Ácido úrico urinário

O ácido úrico urinário apresentou diminuição de 42% no grupo HF quando comparado ao grupo C ($p=0,045$). Porém, o tratamento foi capaz de aumentar em 46% esse parâmetro no grupo CE ($p=0,04$) e em 53% no grupo HFE ($p=0,046$), comparados aos grupos C e HF respectivamente, tabela 4.

Segundo os resultados do *Two-way* ANOVA, a dieta HF possui uma influência de 53,77% na variância total de ácido úrico urinário ($p<0,01$) e o tratamento com empagliflozina influenciou em 28,88% ($p<0,01$) nesse resultado.

Tabela 4 - Bioquímica plasmática e ácido úrico urinário

Parâmetros	C	CE	HF	HFE
Triglicerídeos (mg/dL)	48,5±1,7	38,9±2,1 ^a	54,9±1,5 ^a	53,6±4
Colesterol total (mg/dL)	117,9±3,7	124,2±8	132,8±5,4 ^a	107,7±5,9 ^b
Ácido úrico (mg/dL)	6,1±0,2	6,5±0,2 ^a	7,6±0,5 ^a	6,3±0,3 ^b
Ácido úrico urinário (mg/dL)	9974±2099	13598±884	5744±1535 ^a	8763±793 ^b

Legenda: C- controle; CE- controle + empagliflozina; HF- *high fat diet*; HFE- *high-fat diet* + empagliflozina. Análise estatística feita pelo teste ANOVA de um fator e pós-teste de Tamhane T2 e considerando significativo $p<0,05$. Diferenças apresentadas como: a≠C; b≠HF.

4.13 Coração

4.13.1 Massa do coração e do VE

A massa do coração do grupo HF apresentou aumento de 24% em comparação ao grupo C ($p<0,01$). De modo oposto, a massa do coração do grupo HFE foi 18% menor quando comparado a sua contraparte não tratada ($p<0,01$). Entre os grupos C e CE não foi observada diferença estatisticamente significante ($p=0,76$), tabela 5.

A massa do VE se comportou de forma semelhante, apresentou aumento de 22% no grupo HF, quando comparado ao grupo C ($p<0,01$). A massa do VE do grupo HFE foi 9% menor quando comparado a seu homólogo ($p=0,04$) e os grupos C e CE não apresentaram diferenças significativas entre si ($p=0,99$), tabela 5

Os resultados do *Two-Way* ANOVA para massa do VE mostraram que a dieta HF é a principal responsável pela variância total da massa do VE (50,19%).

4.13.2 Hidroxirolina

A quantidade total de colágeno no miocárdio, estimada pela dosagem de hidroxirolina, não apresentou diferença significativa entre os grupos C e HF ($p>0,99$). Após o tratamento também não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (C x CE: $p=0,94$; HF x HFE: $p=0,99$), tabela 5.

Tabela 5 - Resultados de massa e hidroxirolina no coração.

Parâmetros	C	CE	HF	HFE
Massa do coração (g)	0,11±0,008	0,11±0,005	0,14±0,009 ^a	0,11±0,007 ^b
Massa coração/tíbia (g/cm)	0,005±0,0002	0,005±0,0003	0,007±0,0006 ^a	0,006±0,0003 ^b
Massa VE (g)	0,06±0,002	0,07±0,007	0,08±0,003 ^a	0,07±0,004 ^b
Massa VE/tíbia (g/cm)	0,003±0,0001	0,004±0,0001 ^a	0,004±0,0001 ^a	0,004±0,000001 ^b
Hidroxirolina (µg/mg)	1,65±0,27	1,52±0,2	1,61±0,39	1,53±0,2

Legenda: C– controle; CE- controle + empagliflozina; HF– high-fat diet; HFE– *high-fat diet* + empagliflozina.

Análise estatística feita pelo teste ANOVA de um fator e pós-teste de *Tamhane* T2 e considerando significativo $p<0,05$. Diferenças apresentadas como: ^a≠C; ^b≠HF.

4.13.3 Espessura Ventricular Esquerda

A espessura da parede do VE do grupo HF apresentou aumento significativo em comparação ao grupo C (+20%, $p<0,01$). Porém, o grupo HFE apresentou uma diminuição significativa na espessura do VE em comparação ao grupo HF (-15%, $p<0,01$), figura 12. A análise do *Two-way* ANOVA revelou uma interação entre medicamento e dieta HF responsável por 87,52% na variância total ($p<0,01$).

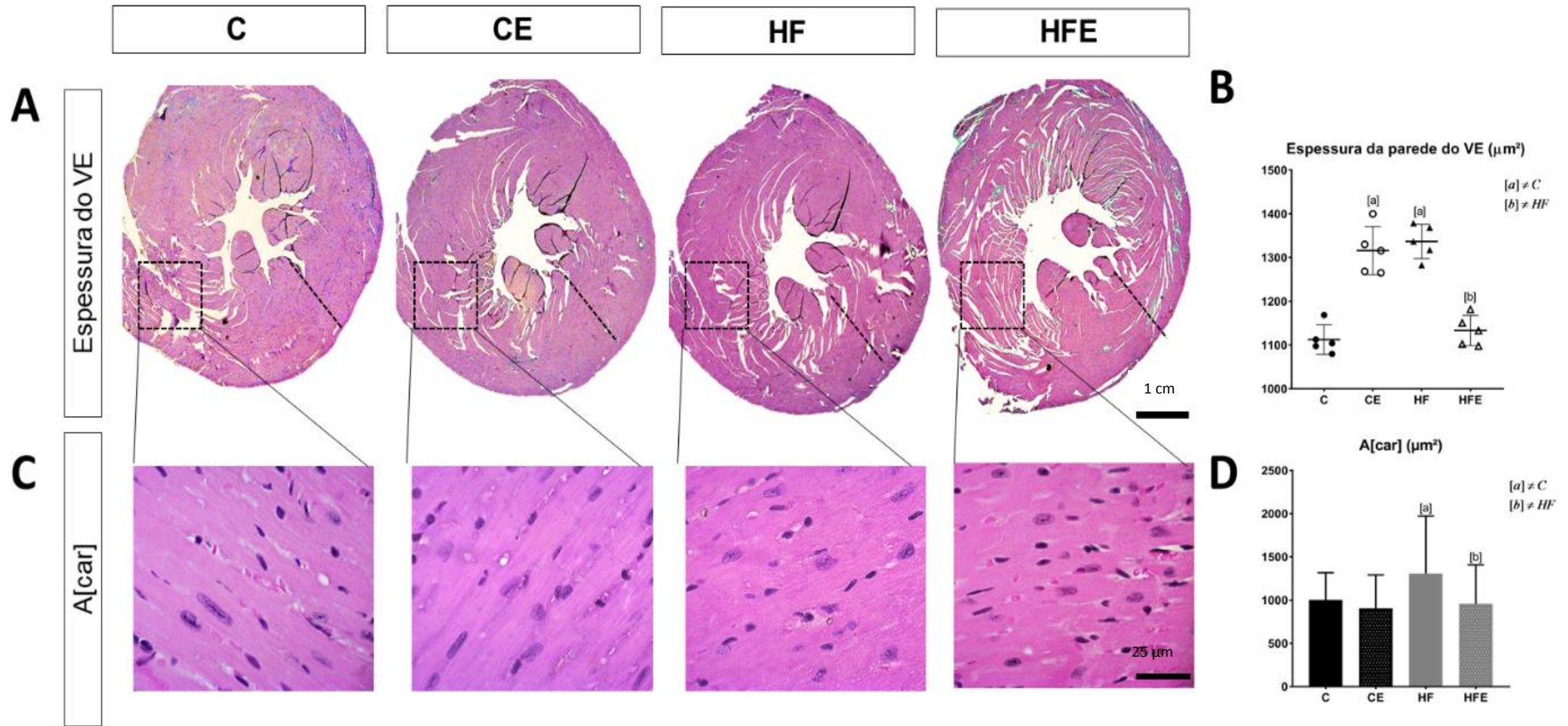
4.13.4 Área Seccional Média dos Cardiomiócitos- A[car]

O grupo HF apresentou um aumento de 30% na A[car], quando comparado ao grupo C ($p=0,03$). Já a A[car] do grupo HFE apresentou redução significativa de 27%

em comparação ao grupo HF ($p=0,02$). Entre os grupos C e CE não foi observada diferença ($p=0,66$). Esses resultados podem ser observados na figura 13.

O *Two-way ANOVA* mostrou maior interferência da empagliflozina sobre a variância total da A[car], correspondente a 5,15% ($p<0,01$).

Figura 13: Espessura Ventricular Esquerda e Área Seccional média dos cardiomiócitos (A[car]).



Legenda: **A-** Imagens no plano valvar no ventrículo esquerdo (VE) coradas com hematoxilina e eosina (HE) (x2). A linha pontilhada representa o mesmo tamanho nos 4 grupos facilitando a visualização da diferença entre eles. **B-** Representação gráfica da espessura do VE (μm^2). **C-** Cardiomiócitos corados com HE (x60) **D-** Representação gráfica da área seccional média dos cardiomiócitos (A[car]) (μm^2). C– controle; CE– controle + empagliflozina; HF– *high-fat diet*; HFE– *high fat diet* + empagliflozina. Análise estatística com teste ANOVA de um fator e pós-teste de *Tamhane* T2 e considerando significativo $p < 0,05$. Diferenças apresentadas como: [a] $\neq$ C; [b] $\neq$ HF.

4.14 PCR

4.14.1 Sistema Renina Angiotensina - VE

Em uma visão geral, houve uma melhora do SRA local no VE com a diminuição na expressão dos genes relacionados a via clássica e aumento na via alternativa após o tratamento com empagliflozina, figura 14

A *Renina*, enzima limitante do SRA, apresentou um aumento considerável de 179% no grupo HF em comparação com o grupo C ($p=0,03$), por outro lado, o grupo HFE mostrou uma diminuição de 86% quando comparado a sua contraparte ($p=0,01$), o grupo CE não apresentou diferença estatisticamente significativa do grupo C ($p=0,99$).

A enzima *Eca*, responsável pela clivagem de Ang I, não apresentou diferença entre os grupos C e HF ($p>0,99$), mas após o tratamento o grupo CE apresentou uma diminuição de 69% quando comparado a sua contraparte ($p<0,01$) e o mesmo comportamento foi observado no grupo HFE em comparação ao grupo HF (-52% $p=0,03$).

O *At1r* é o principal receptor das funções mediadas por Ang II em camundongos, não apresentou diferença significativa entre os grupos C e HF ($p>0,99$), nem entre C e CE ($p=0,45$). Contudo a expressão do *At1r* foi significativamente menor no grupo HFE quando comparado ao grupo HF (-60%, $p=0,03$).

Em relação aos efeitos do eixo de contra regulatório, o *At2r* tem sido reconhecido como parte integrante do braço protetor do SRA, o *At2r*, apresentou redução significativa no grupo HF em comparação ao grupo C (-48% $p<0,01$), e o tratamento aumentou sua expressão no grupo HFE comparado ao grupo HF (+136% $p<0,01$). Entre os grupos C e CE não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p=0,15$).

A *Eca2*, é um novo homólogo da *Eca*, que se liga ao receptor MASr um importante receptor do eixo contra regulatório. A *Eca2* apresentou uma redução significativa no grupo HF comparado ao grupo C (-42%, $p=0,01$), entre os grupos

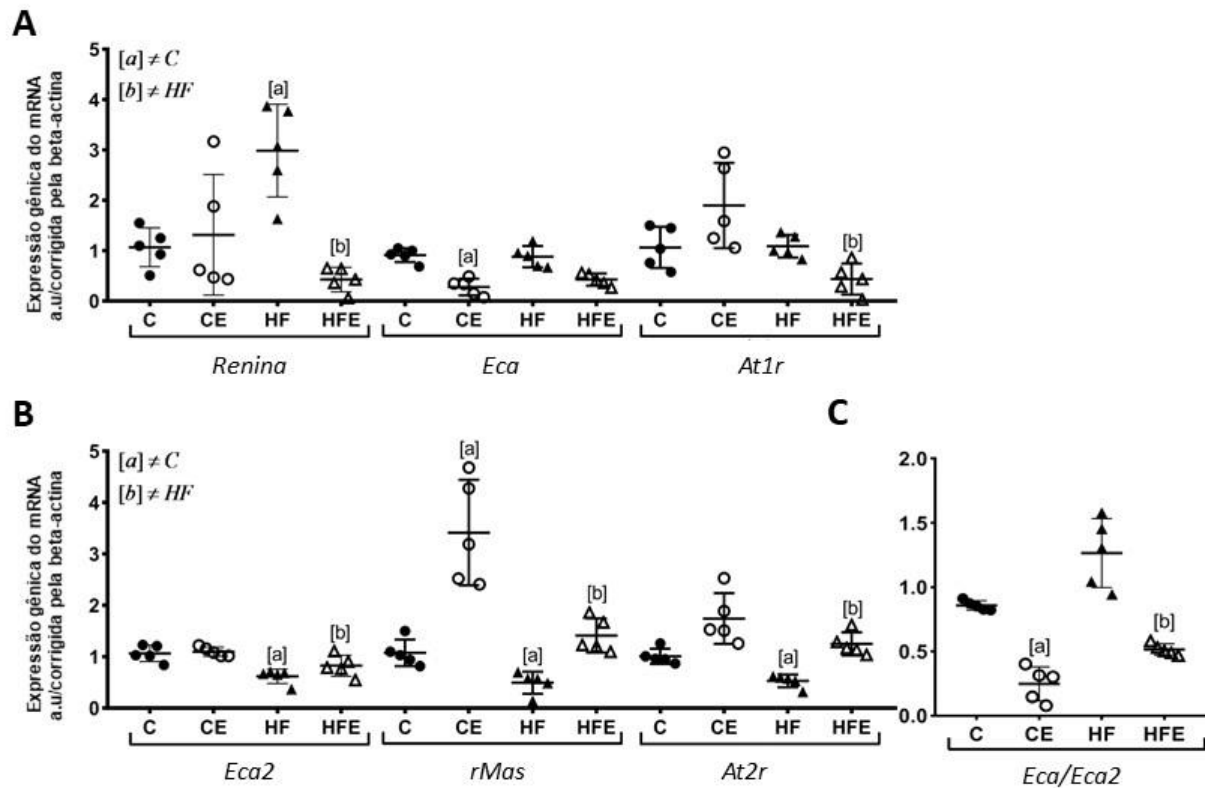
tratados não foi apresentada diferença significativa (C x CE: $p=0,99$; HF x HFE: $p=0,49$).

O receptor *Masr* apresentou uma diminuição significativa no grupo HF quando comparado ao grupo C (-54%, $p=0,03$). Após o tratamento, sua expressão aumentou significativamente tanto no grupo CE (+217%, $p=0,03$) quanto no grupo HFE (+185%, $p<0,01$) comparados as suas contrapartes não tratadas.

A relação entre a expressão de *Eca1/Eca2* foi realizada para verificar qual via foi preferencialmente ativa. Essa relação mostrou que no grupo C existe um equilíbrio de ação entre elas e o grupo HF parece ter um aumento na expressão de *Eca1*, com um aumento nessa relação. Mesmo assim, a diferença entre C e HF não foi estatisticamente significativa ($p=0,15$). Já os grupos tratados, apresentam uma relação *Eca1/Eca2* menor que suas contrapartes, mostrando uma maior ativação da enzima ECA2 (C x CE: $p<0,01$; HF x HFE: $p=0,02$).

O *Two-way* ANOVA revelou que tanto *Renina* quanto *At1r* apresentaram uma maior influência da interação entre medicamento-dieta na sua expressão (35,44%, $p<0,01$ e 28,98%, $p<0,01$ respectivamente). *Eca1* (43,74%, $p<0,01$), *At2r* (75,58%, $p<0,01$) e *Masr* (45,27%, $p<0,01$) apresentaram uma maior influência no tratamento com empagliflozina em suas expressões. Já *Eca2* apresentou maior influência da dieta HF em sua expressão (56,34%, $p<0,01$).

Figura 14: Expressão gênica do Sistema Renina Angiotensina local no VE.



Legenda: Expressão gênica da via do sistema renina angiotensina no ventrículo esquerdo corrigidos pela expressão de β -actina. **A-** Genes relacionados à via clássica. **B-** Genes relacionados à via contra-regulatória. **C-** Relação entre a expressão de *Eca* e *Eca2* (*Eca/Eca2*). C- controle; CE- controle + empagliflozina; HF- *high-fat diet*; HFE- *high fat diet* + empagliflozina. Análise estatística com teste ANOVA de um fator e pós-teste de *Tamhane T2* e considerando significativo $p < 0,05$. Diferenças apresentadas como: [a] $\neq$ C; [b] $\neq$ HF.

4.14.2 Estresse do retículo endoplasmático - ERE

Evidências mostram que o ERE contribui para DCVs, a *Atf4* (*Activating transcription factor-4*), é o maior regulador desse estresse, e apresentou aumento no grupo HF comparado ao grupo C (+60%, $p=0,04$). O tratamento com empagliflozina diminuiu a expressão de *Atf4* tanto no grupo CE (-46%, $p=0,02$), quanto no grupo HFE (-56%, $p<0,01$).

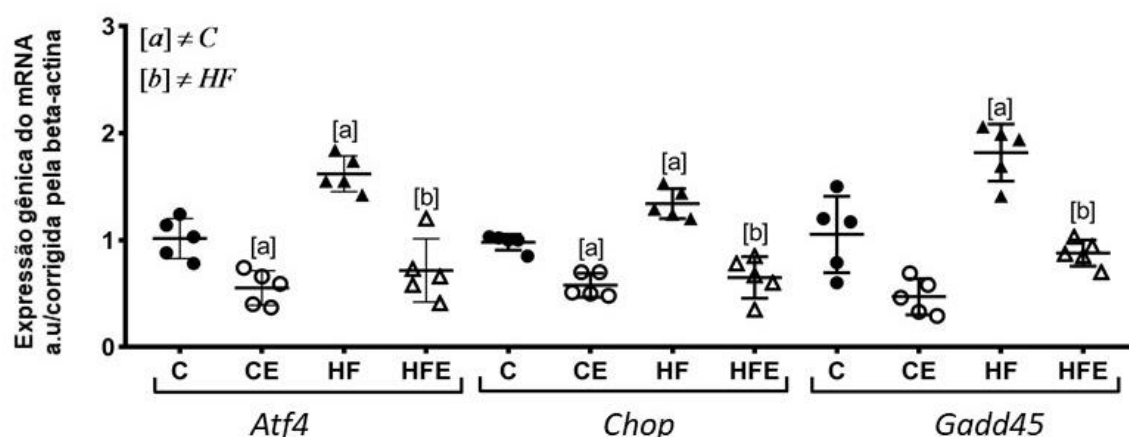
Por sua vez o *Chop* (*C/EBP-homologous protein*) é um biomarcador amplamente investigado envolvido na sinalização apoptótica associada ao ERE na DCV, apresentou aumento de 37% na sua expressão no grupo HF comparado ao C

($p=0,01$), o tratamento reduziu sua expressão tanto no grupo CE (-41%, $p<0,01$) quanto no grupo HFE (-61%, $p<0,01$) em relação às suas partes não tratadas.

Gadd45, representa um sinal de estresse em resposta fisiológica ou ambiental, sua expressão apresentou um aumento de 73% ($p=0,03$) no grupo HF em comparação ao grupo C. No entanto, o tratamento diminuiu significativamente sua expressão no grupo HFE (-52% $p<0,01$) comparado ao seu homólogo. O grupo CE não apresentou diferença estatisticamente significativa do grupo C ($p=0,1$), figura 15.

Segundo resultados do *Two-way ANOVA*, os três genes analisados mostraram ter maior influência do medicamento em sua expressão (*Atf4*: 57,27, $p<0,01$; *Chop*: 70,01%, $p<0,01$ e *Gadd45*: 50,39%, $p<0,01$).

Figura 15: Expressão gênica do estresse do retículo endoplasmático



Legenda: Expressão gênica da via do estresse do retículo endoplasmático no coração corrigidos pela expressão de β -actina. C– controle; CE- controle + empagliflozina; HF– *high fat diet*; HFE– *high fat diet* + empagliflozina. Análise estatística com teste ANOVA de um fator e pós-teste de *Tamhane T2* e considerando significativo $p<0,05$. Diferenças apresentadas como: [a]≠C; [b]≠HF.

4.14.3 Via estresse oxidativo

O estresse oxidativo está associado a distúrbios metabólicos, como hipertensão, e leva à hipertrofia do VE e insuficiência cardíaca. No entanto, existem enzimas antioxidantes para proteger os sistemas biológicos. Dessa forma, algumas

enzimas antioxidantes foram analisadas. A enzima *Catalase* apresentou redução significativa no grupo HF em comparação ao grupo C (-64%, $p<0,01$). Após o tratamento tanto o grupo CE quanto HFE aumentaram a expressão desse gene (+104%, $p=0,04$) e (+118%, $p<0,01$), respectivamente, comparados a suas contrapartes.

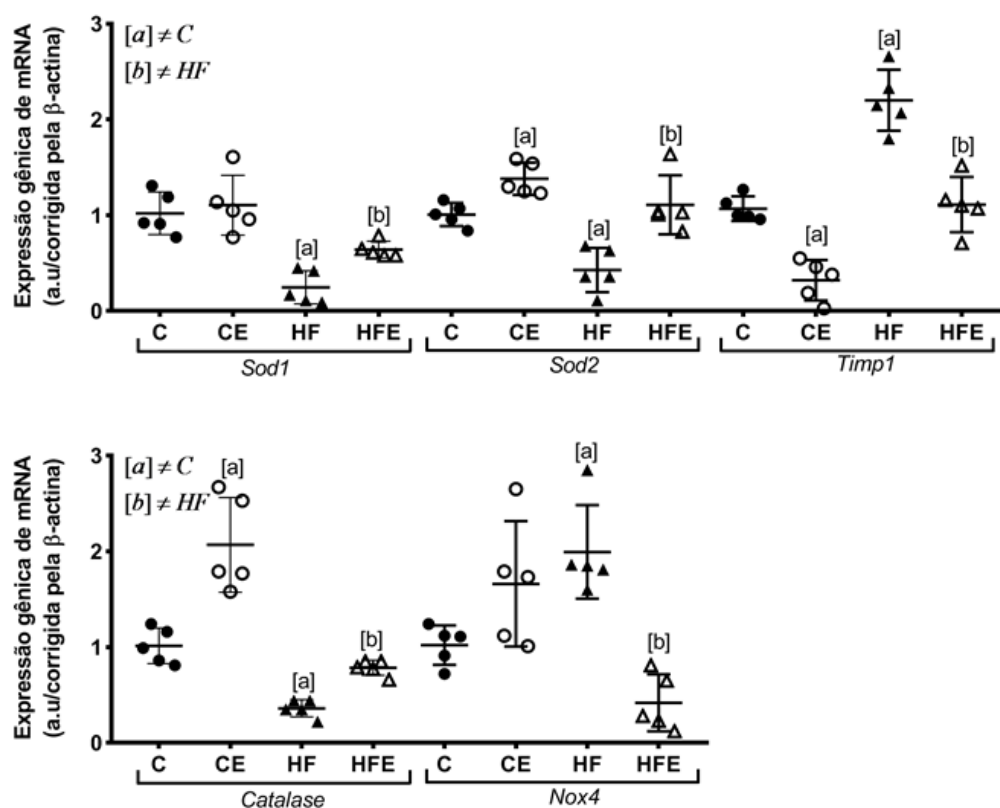
A enzima *Sod1* apresentou redução significativa no grupo HF quando comparado ao grupo C (-76%, $p<0,01$), por outro lado, o grupo HFE apresentou maior expressão em comparação ao grupo HF (+159%, $p=0,02$). A enzima *Sod2* apresentou diminuição significativa no grupo HF quando comparado com o grupo C (-58%, $p=0,02$), enquanto o grupo HFE apresentou aumento significativo quando comparado com o grupo HF (+159%, $p=0,03$).

A enzima NOX4 é responsável pela proteção cardíaca e vascular, a expressão de *Nox4* apresentou um aumento significativo comparando o grupo HF em comparação ao grupo C (+95%, $p=0,047$), já no grupo HFE houve uma diminuição de 79% na expressão de *Nox4* comparado ao grupo HF ($p<0,01$).

TIMP1 é responsável por diminuir a degradação de colágeno, sua expressão no grupo HF apresentou um aumento de 106% quando comparado ao grupo C ($p<0,01$). Após o tratamento o grupo HFE apresentou uma diminuição de 50% ($p<0,01$) e o grupo CE uma diminuição de 70% ($p<0,01$) comparados às suas contrapartes não tratadas, figura 16.

As análises com *Two-way* ANOVA mostraram que *Sod1*, *Catalase* e *Timp1* possuem uma maior influência da dieta HF na variância total de suas expressões (*Sod1*: 63,05%, $p<0,01$; *Catalase*: 51,38%, $p<0,01$; *Timp1*: 46,36%, $p<0,01$). Já *Sod2* mostrou uma maior influência do tratamento na variância de sua expressão (43,67%, $p<0,01$) e a enzima *Nox4* apresentou uma maior influência da interação entre dieta e tratamento (58,35%, $p<0,01$).

Figura 16: Expressão gênica da via do estresse oxidativo



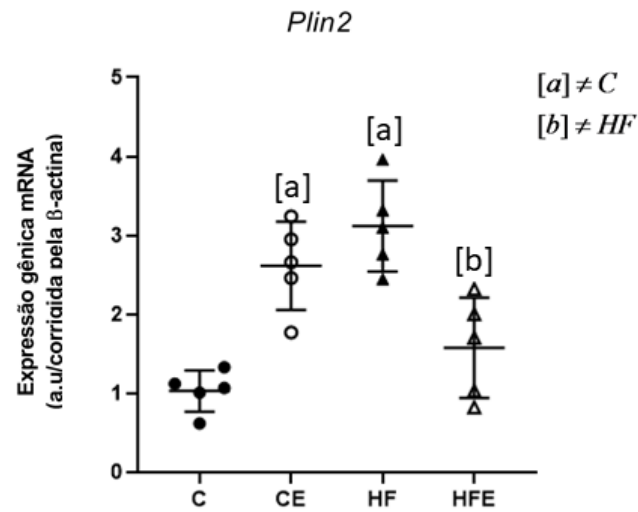
Legenda: Expressão gênica da via do estresse oxidativo no coração corrigidos pela expressão de β -actina. C– controle; CE– controle + empagliflozina; HF– *high-fat diet*; HFE– *high-fat diet* + empagliflozina. Análise estatística com teste ANOVA de um fator e pós-teste de *Tamhane T2* e considerando significativo $p < 0,05$. Diferenças apresentadas como: [a]≠C; [b]≠HF.

4.14.4 Gotícula lipídica (*Plin2*)

A expressão de *Plin2*, indica o aumento de gotículas lipídicas, e se mostrou aumentada em 203% no grupo HF comparado ao grupo C ($p < 0,01$). O tratamento mostrou resultados em ambos os grupos tratados, porém esses resultados se mostraram opostos, o grupo HFE diminuiu 50% sua expressão ($p = 0,02$) comparado ao grupo HF, enquanto o grupo CE aumentou a expressão de *Plin2* em 154% comparado ao grupo C ($p = 0,01$), figura 17.

A análise de *Two-way* ANOVA indicou que empagliflozina, dieta HF e a interação entre ambos possui influência na expressão de *Plin2* ($p < 0,01$), contudo a dieta HF é a principal responsável pelos resultados apresentados, contribuindo com 39,75% da variância total da expressão de *Plin2*.

Figura 17: Expressão gênica de *Plin2* no VE.



Legenda: Expressão gênica de *Plin2* no coração corrigidos pela expressão de β -actina. C– controle; CE– controle + empagliflozina; HF– *high-fat diet*; HFE– *high-fat diet* + empagliflozina. Análise estatística com teste ANOVA de um fator e pós-teste de *Tamhane* T2 e considerando significativo $p < 0,05$. Diferenças apresentadas como: [a] $\neq$ C; [b] $\neq$ HF.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi investigado um modelo experimental de camundongos C57BL/6 alimentado com dieta hiperlipídica que desencadeou alterações na PA, hipertrofia ventricular esquerda e em importantes vias, como SRA cardíaco, ERE e estresse oxidativo. Por outro lado, o inibidor da SGLT2, empagliflozina, apresentou resultados positivos nas vias mencionadas.

No presente estudo, a empagliflozina apresentou redução da massa corporal em cerca de 7%, devido o tratamento com empagliflozina levar à excreção contínua de cerca de 60-100g de glicose na urina, correspondendo a uma perda calórica que contribui para a perda de peso (Pereira e Eriksson, 2019). Além disso a perda de água através da diurese também contribui para diminuição da massa corporal (Filippatos *et al.*, 2019).

Tanto a glicose quanto a insulina dos animais tratados diminuíram, caracterizando uma diminuição na resistência à insulina. A resistência à insulina pode ser um fator para o dano ao tecido cardíaco ao induzir lipogênese *de novo* no fígado e aumento da lipotoxicidade em tecidos-alvo, como o coração e rim (Meikle e Summers, 2017). Estudos anteriores já descreveram empagliflozina e outros inibidores do SGLT2 diminuindo a concentração de insulina (Tahara *et al.*, 2014). A concentração de insulina também pode ser afetada pela concentração de colesterol. O presente estudo mostrou a influência da empagliflozina na diminuição do colesterol plasmático total, corroborando com estudos anteriores (Aragon-Herrera *et al.*, 2019), provavelmente este resultado pode resultar da redução da depuração de LDL e aumento da lipólise de TG (Basu *et al.*, 2018).

Dado que a hiperuricemia é um fator contribuinte no desenvolvimento da hipertensão, um fator de risco para DCV (Mancia *et al.*, 2015), nossos resultados demonstraram que o tratamento com empagliflozina diminuiu a concentração plasmática de ácido úrico, enquanto aumentou sua excreção urinária; reduções no ácido úrico também foram relacionadas no EMPA-REG OUTCOME (Zinman *et al.*, 2015), bem como na metanálise de 12 ensaios clínicos randomizados que mostraram a empagliflozina, reduzindo a concentração sérica de ácido úrico (Zhao *et al.*, 2019). A redução do ácido úrico pela empagliflozina ocorre possivelmente devido ao aumento

da concentração de glicose no GLUT 9 na membrana basolateral do túbulo proximal e ao consequente aumento da uricosúria (Heise *et al.*, 2016).

O manejo da hipertensão é fundamental para a redução da morbidade cardiovascular; esta é uma recomendação importante da *Food and Drugs* para que todos os tratamentos para diabetes tenham um benefício cardiovascular como pré-requisito (Scheen, 2015). Nesse contexto, o tratamento com empagliflozina no presente estudo mostrou efeitos positivos na redução da PA sistólica no grupo HFE, este resultado concorda com algumas evidências e sugere que os inibidores do SGLT2 fornecem uma redução notável na PA (Cherney *et al.*, 2014a; Zinman *et al.*, 2015; Abdul-Ghani *et al.*, 2016; Kimura *et al.*, 2019; Takasu e Takakura, 2019). Apesar disso, o mecanismo preciso da redução da PA permanece incompletamente elucidado, alguns mecanismos envolvidos estão principalmente relacionados à diurese induzida pelo fármaco (Scheen, 2015; Takasu e Takakura, 2019; Yurista *et al.*, 2019), perda de peso (Sjostrom *et al.*, 2015) e SRA (Abdelrahman *et al.*, 2019).

Interessante notar que a hipertensão é responsável pelo aumento da espessura do VE como mecanismo compensatório (Verma *et al.*, 2019). De acordo com os dados apresentados, o grupo HF apresentou aumento da espessura do VE, apresentando uma hipertrofia do VE, e isso pode estar relacionado ao aumento da massa do VE e da PA sistólica, por outro lado, o tratamento com empagliflozina também diminui a espessura do VE no grupo HFE. Os inibidores do SGLT2 foram associados a melhorias na regressão da hipertrofia do VE (Natali *et al.*, 2017) e remodelação cardíaca (Cherney *et al.*, 2014a).

Contudo, de forma inesperada, o grupo CE apresentou uma hipertrofia do VE mesmo se apresentando normotenso. Verma e colaboradores relataram em um estudo que provavelmente a empagliflozina age por outros mecanismos, que não a diminuição da PA, mas esses mecanismos ainda precisam ser elucidados (Verma *et al.*, 2019), algumas propostas são a diurese osmótica, redução da inflamação estresse oxidativo, espessamento arterial, diminuição na massa corporal e efeitos renoprotetores (Verma, 2019).

Outro possível mecanismo de hipertrofia independente do aumento da PA, é o aumento da concentração de ácido úrico plasmático (Liu *et al.*, 2019), o que também foi observado no grupo CE, neste sentido o ácido úrico é uma marcado indireto da xantina oxidase (Otaki *et al.*, 2017), que age estimulando a via mTOR/S6K levando a hipertrofia do VE (Jia *et al.*, 2015).

Embora, nossos resultados mostraram que os animais que receberam uma dieta rica em gordura apresentavam HC, PA sistólica mais alta e intolerância à glicose, a análise histológica e um ensaio bioquímico específico mostraram que o conteúdo de colágeno no miocárdio não foi afetado significativamente nesses animais. Isso pode ser devido à duração da dieta rica em gordura no estudo atual; De fato, quando os camundongos são alimentados com uma dieta rica em gordura por períodos mais longos, como 24 semanas, foi relatada fibrose intersticial no miocárdio (Zhang *et al.*, 2017). Além disso, como o conteúdo de colágeno no miocárdio permaneceu inalterado em nossos grupos tratados com empagliflozina em comparação aos controles, um efeito direto desse medicamento na expressão gênica do colágeno é menos provável. As melhorias na fibrose cardíaca, conforme relatadas em investigações usando modelos animais, podem estar relacionadas a um efeito da empagliflozina em mediadores inflamatórios e/ou de reparo tecidual. De fato, a empagliflozina reduz o estresse oxidativo e a infiltração de monócitos/macrófagos no coração de camundongos com SM (Yamamoto *et al.*, 2006; Kusaka *et al.*, 2016).

O aumento do estresse oxidativo promove a hipertrofia dos cardiomiócitos e aumenta a expressão do colágeno tipo I, TGF- β 1 e TIMP1 (He *et al.*, 2015). TIMP1 é uma enzima que inibe a degradação do colágeno, aumentando então sua concentração celular. Neste estudo, foi observado um aumento na expressão de *Timp1* em animais alimentados com dieta HF, e o tratamento com empagliflozina foi capaz de diminuir essa expressão gênica nos dois grupos tratados. Além disso, com base nos dados apresentados, há um aumento das enzimas antioxidantes cardíacas através da expressão dos genes *Catalase*, *Sod1* e *Sod2* após o tratamento com empagliflozina. Existem poucos estudos relacionando a expressão dessas enzimas no coração de animais tratados com empagliflozina, mas esses mostram que *Sod2* e *Catalase* aumentam (Mizuno *et al.*, 2018), enquanto *Nox1* e *Nox2* diminuem (Yang *et al.*, 2019) após o tratamento.

O presente estudo também demonstrou que a empagliflozina pode regular negativamente o nível de NOX4 no VE dos animais alimentados com alto teor de gordura, NOX4, é a principal isoforma NAD(P)H oxidase nos cardiomiócitos, que está associada à CMD (Li *et al.*, 2019). Dessa maneira, esses resultados indicam que a empagliflozina pode atenuar o estresse oxidativo elevando a expressão das enzimas antioxidantes e reduzindo os produtos de oxidação no VE dos camundongos alimentados com dieta HF.

O SRA é um componente central das respostas fisiopatológicas do sistema cardiovascular e da síndrome cardiorrenal. O aumento da estimulação aguda com Ang II regula a homeostase hidroeletrolítica e a vasoconstrição, modulando a PA, por outro lado, a estimulação crônica promove a hipertrofia das células do músculo liso vascular (VSMCs) (Xi *et al.*, 1999). Principalmente a Ang II, atuando via receptor AT1r, demonstrou levar a descompensação cardíaca progressiva, remodelação cardíaca e insuficiência cardíaca (Jin *et al.*, 2019).

O SRA tem duas rotas de ativação com ações opostas. A via clássica ocorre através da conversão de Ang I em Ang II pela enzima ECA. Ang II atua através do Atr1 e contribui para a resistência à insulina (Cooper *et al.*, 2007), fibrose cardíaca (Guan *et al.*, 2019), produção de ERO, inflamação (Hunyady e Catt, 2006), lesão renal (Reyes-Pardo *et al.*, 2019) hipertrofia de cardiomiócitos e do VE (Schluter e Wenzel, 2008) e peso do VE (Nakayama *et al.*, 2015). Além dessa via clássica, existe um eixo não clássico onde a Ang II pode atuar pelo receptor At2, culminando em efeitos contrários aos causados por sua ação no receptor At1. Além disso, na via não clássica, a ECA2 produz Ang(1,7), que ativa o receptor Mas, levando à vasodilatação arteriolar sistêmica, natriurese, diurese, estresse oxidativo reduzido e atividade antiproliferativa, aumentando o óxido nítrico e a prostaglandina (Burrell *et al.*, 2004; Chappell, 2012). Dessa forma, através do receptor Mas, a Ang II reduz as vias de sinalização consideradas responsáveis pela fibrogênese e inflamação crônica (Padda *et al.*, 2015).

Apesar de não estar claro o papel dos inibidores do SGLT2 no SRA do VE, a supressão do SRA intrarrenal foi demonstrada em resposta à inibição do SGLT2 em modelos experimentais de DM2 (Shin *et al.*, 2016; Woods *et al.*, 2019) e pode, assim, contribuir para a redução em complicações cardiovasculares (Silva Dos Santos *et al.*, 2020). Sugerindo o possível papel da empagliflozina na melhora do SRA local, avaliamos sua expressão gênica em vias clássicas e não clássicas. Os genes da via clássica *Renina*, *Eca1* e *At1r*, responsáveis por efeitos de elevação da PA, hipertrofia do VE e lesão renal, apenas a expressão de *Renina* se mostrou aumentada no grupo HF, porém esses três marcadores apresentaram menor expressão após o tratamento.

Por outro lado, na via não clássica, considerado o eixo contra-regulador, a dieta HF foi responsável por diminuir a expressão de *Eca2*, *At2r* e *Masr* no VE enquanto a empagliflozina aumentou a expressão dos genes *At2r* e *Masr*. A expressão de *Eca2* não mostrou nenhuma diminuição em sua expressão, por isso realizamos a relação

entre o *Eca1/Eca2*, na qual relações maiores que 1 indicam uma preferência pela via clássica (Wang *et al.*, 2015). Essa relação neste modelo experimental mostrou que a empagliflozina manifesta preferência pela via não clássica, levando à proteção cardiovascular.

Alguns inibidores do SGLT2 têm mostrado um aumento na ativação do SRA circulante que pode estar associado a um mecanismo compensatório para a perda de água e sódio que ocorre no início do tratamento (Li *et al.*, 2018a). Também foi relatado que há um aumento de Ang II após o uso da empagliflozina, mas esse aumento não é prejudicial devido à ação desse hormônio via receptor AT2 e ao aumento concomitante da Ang(1-7) (Muskiet *et al.*, 2015). No entanto, alguns estudos mostraram uma diminuição no SRA através da diminuição do angiotensinogênio (Shin *et al.*, 2016) e Ang II (Shin *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2019) e no aumento da excreção de renina (Eickhoff *et al.*, 2019) após o tratamento com outros inibidores do SGLT2. Quanto a expressão do SRA local no coração, este estudo foi o primeiro a verificar a expressão local dessa via após o uso de empagliflozina.

É interessante notar que Ang II atua para estimular EROs via receptor AT1, estimulando NOX2 e NOX4, produtores de radicais livres, e diminuindo SOD1 e catalase, que controlam e impedem a formação de radicais livres (Hunyady e Catt, 2006). Como foi observado um aumento local na expressão de *Renina*, acreditamos que exista uma maior concentração de Ang II no VE. Sendo assim, também foi avaliada a ação da empagliflozina na geração de EROs do coração, bem como seu nessas vias.

Outra importante via avaliada foi o RE que é responsável pela degradação de proteínas e organelas danificadas no interior das células e desempenha um papel crítico na lesão cardíaca relacionada à obesidade (Hsu *et al.*, 2016) e à hipertrofia cardíaca (Guan *et al.*, 2011). Sabe-se também que o aumento da Ang II devido à hipertensão aumenta a expressão de genes relacionados ao ERE, como *Chop*, *Atf4*, *Bip* e *Gadd45* (Young, 2017; Menikdiwela *et al.*, 2019). O ATF4 regula a tradução de proteínas durante o ERE e estimula a expressão do *Chop*, um fator de transcrição que induz a apoptose através de vários mecanismos e a indução da resposta a danos no DNA através do aumento da expressão de *Gadd45* poderia enfatizar o estresse celular, levando também à apoptose (Martinez-Pizarro *et al.*, 2016). No presente estudo, os marcadores de ERE no VE aumentaram no grupo HF, demonstrando estresse reticular nesse grupo, mas a empagliflozina melhorou a expressão desse

marcador. Este efeito já foi descrito após o tratamento com empagliflozina em outros órgãos (Zhou e Wu, 2017; Daems *et al.*, 2019; Petito-da-Silva *et al.*, 2019) e outros SGLT2i (Hosokawa *et al.*, 2019).

Além disso, avaliamos a expressão *Plin2*, no VE, que é a única proteína constitutiva expressa ubiquamente na gota lipídica que tem sido usada como marcador de proteína para gotículas lipídicas e correlacionada com uma dieta HF (Chang *et al.*, 2006). Aqui, mostramos uma expressão mais baixa dessa proteína nos dois grupos de tratamento no VE. A redução na massa corporal leva a uma diminuição da gordura acumulada nos órgãos e provavelmente as gotículas lipídicas e a expressão de *Plin2* a longo prazo, o que pode estar relacionado à proteção cardiovascular (Rajasekeran *et al.*, 2016).

Os resultados encontrados sobre ação da empagliflozina no grupo HF são ilustrados em um resumo gráfico na figura 18.

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que o tratamento com empagliflozina apresentou efeitos benéficos nas modificações do VE associadas as alterações metabólicas induzidas por uma dieta hiperlipídica, melhorando o controle da massa corporal, da tolerância a glicose, ácido úrico e pressão arterial. Além disso, a empagliflozina modulou positivamente a via do SRA no VE no sentido de atenuar o estresse oxidativo e o ERE, o que pode ser um caminho para seus efeitos na melhora da remodelação cardíaca adversa presente nas DCVs. Assim, o efeito cardioprotetor da empagliflozina ficou evidente em animais alimentados com uma dieta rica em gordura e pode ser uma ferramenta importante para evitar a progressão das DCVs.

REFERÊNCIAS

- Abdelrahman AM, Al Suleimani Y, Shalaby A, Ashique M, Manoj P, Nemmar A et al. Effect of canagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor, on cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2019; 392: 45-53 (doi: 10.1007/s00210-018-1564-7)
- Abdul-Ghani M, Del Prato S, Chilton R, DeFronzo RA. SGLT2 Inhibitors and Cardiovascular Risk: Lessons Learned From the EMPA-REG OUTCOME Study. *Diabetes Care* 2016; 39: 717-725 (doi: 10.2337/dc16-0041)
- Ali Q, Wu Y, Hussain T. Chronic AT2 receptor activation increases renal ACE2 activity, attenuates AT1 receptor function and blood pressure in obese Zucker rats. *Kidney Int* 2013; 84: 931-939 (doi: 10.1038/ki.2013.193)
- Aragon-Herrera A, Feijoo-Bandin S, Otero Santiago M, Barral L, Campos-Toimil M, Gil-Longo J et al. Empagliflozin reduces the levels of CD36 and cardiotoxic lipids while improving autophagy in the hearts of Zucker diabetic fatty rats. *Biochem Pharmacol* 2019; 170: 113677 (doi: 10.1016/j.bcp.2019.113677)
- Ashrafi Jigheh Z, Ghorbani Haghjo A, Argani H, Roshangar L, Rashtchizadeh N, Sanajou D et al. Empagliflozin alleviates renal inflammation and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats partly by repressing HMGB1-TLR4 receptor axis. *Iran J Basic Med Sci* 2019; 22: 384-390 (doi: 10.22038/ijbms.2019.31788.7651)
- Ashrafi Jigheh Z, Ghorbani Haghjo A, Argani H, Roshangar L, Rashtchizadeh N, Sanajou D et al. Empagliflozin Attenuates Renal and Urinary Markers of Tubular Epithelial Cell Injury in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Indian J Clin Biochem* 2020; 35: 109-114 (doi: 10.1007/s12291-018-0790-6)
- Astrup A, Dyerberg J, Elwood P, Hermansen K, Hu FB, Jakobsen MU et al. The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010? *Am J Clin Nutr* 2011; 93: 684-688 (doi: 10.3945/ajcn.110.004622)
- Azfer A, Niu J, Rogers LM, Adamski FM, Kolattukudy PE. Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H1411-1420 (doi: 10.1152/ajpheart.01378.2005)
- Bainbridge ML, Cersosimo LM, Wright AD, Kraft J. Content and Composition of Branched-Chain Fatty Acids in Bovine Milk Are Affected by Lactation Stage and Breed of Dairy Cow. *PLoS One* 2016; 11: e0150386 (doi: 10.1371/journal.pone.0150386)
- Basu D, Huggins LA, Scerbo D, Obunike J, Mullick AE, Rothenberg PL et al. Mechanism of Increased LDL (Low-Density Lipoprotein) and Decreased Triglycerides With SGLT2 (Sodium-Glucose Cotransporter 2) Inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018; 38: 2207-2216 (doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311339)
- Basu R, Oudit GY, Wang X, Zhang L, Ussher JR, Lopaschuk GD et al. Type 1 diabetic cardiomyopathy in the Akita (Ins2WT/C96Y) mouse model is characterized by lipotoxicity and diastolic dysfunction with

preserved systolic function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297: H2096-2108 (doi: 10.1152/ajpheart.00452.2009)

Beermann C, Jelinek J, Reinecker T, Hauenschild A, Boehm G, Klor HU. Short term effects of dietary medium-chain fatty acids and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on the fat metabolism of healthy volunteers. *Lipids Health Dis* 2003; 2: 10 (doi: 10.1186/1476-511X-2-10)

Bergman I, Loxley R. Lung tissue hydrolysates: studies of the optimum conditions for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Analyst* 1969; 94: 575-584 (doi: 10.1039/an9699400575)

Berk BC, Corson MA. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res* 1997; 80: 607-616 (doi: 10.1161/01.res.80.5.607)

Bernstein KE, Gonzalez-Villalobos RA, Giani JF, Shah K, Bernstein E, Janjulia T et al. Angiotensin-converting enzyme overexpression in myelocytes enhances the immune response. *Biol Chem* 2014; 395: 1173-1178 (doi: 10.1515/hsz-2013-0295)

Bhupathiraju SN, Hu FB. Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications. *Circ Res* 2016; 118: 1723-1735 (doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306825)

Billingsley HE, Carbone S, Lavie CJ. Dietary Fats and Chronic Noncommunicable Diseases. *Nutrients* 2018; 10: (doi: 10.3390/nu10101385)

Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Rev Endocr Metab Disord* 2010; 11: 31-39 (doi: 10.1007/s11154-010-9131-7)

Bouhnik J, Galen FX, Menard J, Corvol P, Seyer R, Fehrentz JA et al. Production and characterization of human renin antibodies with region-oriented synthetic peptides. *J Biol Chem* 1987; 262: 2913-2918 (doi: 10.1074/jbc.262.17.2913)

Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Munoz JM. The substance causing renal hypertension. *J Physiol* 1940; 98: 283-298 (doi: 10.1113/jphysiol.1940.sp003850)

Brown MJ. Renin: friend or foe? *Heart* 2007; 93: 1026-1033 (doi: 10.1136/hrt.2006.107706)

Burrell LM, Johnston CI, Tikellis C, Cooper ME. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15: 166-169 (doi: 10.1016/j.tem.2004.03.001)

Cabral CA, Sampaio FJ, Cardoso LE. Analysis of the modifications in the composition of bladder glycosaminoglycan and collagen as a consequence of changes in sex hormones associated with puberty or oophorectomy in female rats. *J Urol* 2003; 170: 2512-2516 (doi: 10.1097/01.ju.0000088776.17126.93)

Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 1505S-1519S (doi: 10.1093/ajcn/83.6.1505S)

Calligaris SD, Lecanda M, Solis F, Ezquer M, Gutierrez J, Brandan E et al. Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. *PLoS One* 2013; 8: e60931 (doi: 10.1371/journal.pone.0060931)

- Camelo L, Marinho TS, Aguila MB, Souza-Mello V, Barbosa-da-Silva S. Intermittent fasting exerts beneficial metabolic effects on blood pressure and cardiac structure by modulating local renin-angiotensin system in the heart of mice fed high-fat or high-fructose diets. *Nutr Res* 2019; 63: 51-62 (doi: 10.1016/j.nutres.2018.12.005)
- Cao X, Lu XM, Tuo X, Liu JY, Zhang YC, Song LN et al. Angiotensin-converting enzyme 2 regulates endoplasmic reticulum stress and mitochondrial function to preserve skeletal muscle lipid metabolism. *Lipids Health Dis* 2019; 18: 207 (doi: 10.1186/s12944-019-1145-x)
- Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 2000; 35: 155-163 (doi: 10.1161/01.hyp.35.1.155)
- Cerf ME. Cardiac Glucolipotoxicity and Cardiovascular Outcomes. *Medicina (Kaunas)* 2018; 54: (doi: 10.3390/medicina54050070)
- Chang BH, Li L, Paul A, Taniguchi S, Nannegari V, Heird WC et al. Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 1063-1076 (doi: 10.1128/MCB.26.3.1063-1076.2006)
- Chappell MC. Nonclassical renin-angiotensin system and renal function. *Compr Physiol* 2012; 2: 2733-2752 (doi: 10.1002/cphy.c120002)
- Chasis H, Jolliffe N, Smith HW. The Action of Phlorizin on the Excretion of Glucose, Xylose, Sucrose, Creatinine and Urea by Man. *J Clin Invest* 1933; 12: 1083-1090 (doi: 10.1172/JCI100559)
- Cherney DZ, Perkins BA, Soleymanlou N, Har R, Fagan N, Johansen OE et al. The effect of empagliflozin on arterial stiffness and heart rate variability in subjects with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 2014a; 13: 28 (doi: 10.1186/1475-2840-13-28)
- Cherney DZ, Perkins BA, Soleymanlou N, Maione M, Lai V, Lee A et al. Renal hemodynamic effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in patients with type 1 diabetes mellitus. *Circulation* 2014b; 129: 587-597 (doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005081)
- Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 569-582 (doi: 10.1016/s0735-1097(99)00630-0)
- Cooper SA, Whaley-Connell A, Habibi J, Wei Y, Lastra G, Manrique C et al. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H2009-2023 (doi: 10.1152/ajpheart.00522.2007)
- Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002; 417: 822-828 (doi: 10.1038/nature00786)
- Daems C, Welsch S, Boughaleb H, Vanderroost J, Robert A, Sokal E et al. Early Treatment with Empagliflozin and GABA Improves beta-Cell Mass and Glucose Tolerance in Streptozotocin-Treated Mice. *J Diabetes Res* 2019; 2019: 2813489 (doi: 10.1155/2019/2813489)
- de Albuquerque Rocha N, Neeland IJ, McCullough PA, Toto RD, McGuire DK. Effects of sodium glucose co-transporter 2 inhibitors on the kidney. *Diab Vasc Dis Res* 2018; 15: 375-386 (doi: 10.1177/1479164118783756)

de Oliveira Sa G, Dos Santos Neves V, de Oliveira Fraga SR, Souza-Mello V, Barbosa-da-Silva S. High-intensity interval training has beneficial effects on cardiac remodeling through local renin-angiotensin system modulation in mice fed high-fat or high-fructose diets. *Life Sci* 2017; 189: 8-17 (doi: 10.1016/j.lfs.2017.09.012)

Dehghan M, Mente A, Zhang X, Swaminathan S, Li W, Mohan V et al. Associations of fats and carbohydrate intake with cardiovascular disease and mortality in 18 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *Lancet* 2017; 390: 2050-2062 (doi: 10.1016/S0140-6736(17)32252-3)

Del Razo Olvera FM, Melgarejo Hernandez MA, Mehta R, Aguilar Salinas CA. Setting the Lipid Component of the Diet: A Work in Process. *Adv Nutr* 2017; 8: 165S-172S (doi: 10.3945/an.116.013672)

Deshotels MR, Xia H, Sriramula S, Lazartigues E, Filipeanu CM. Angiotensin II mediates angiotensin converting enzyme type 2 internalization and degradation through an angiotensin II type I receptor-dependent mechanism. *Hypertension* 2014; 64: 1368-1375 (doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03743)

Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006; 444: 881-887 (doi: 10.1038/nature05488)

Di Franco A, Cantini G, Tani A, Coppini R, Zecchi-Orlandini S, Raimondi L et al. Sodium-dependent glucose transporters (SGLT) in human ischemic heart: A new potential pharmacological target. *Int J Cardiol* 2017; 243: 86-90 (doi: 10.1016/j.ijcard.2017.05.032)

dos Santos Moreira C, Serejo F, Alcantara P, Ramalhinho V, Braz Nogueira J. Procollagen type III amino terminal peptide and myocardial fibrosis: A study in hypertensive patients with and without left ventricular hypertrophy. *Rev Port Cardiol* 2015; 34: 309-314 (doi: 10.1016/j.repc.2014.11.014)

Dostal DE, Rothblum KN, Chernin MI, Cooper GR, Baker KM. Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin-angiotensin system in neonatal rat heart. *Am J Physiol* 1992; 263: C838-850 (doi: 10.1152/ajpcell.1992.263.4.C838)

Drenjancevic-Peric I, Jelakovic B, Lombard JH, Kunert MP, Kibel A, Gros M. High-salt diet and hypertension: focus on the renin-angiotensin system. *Kidney Blood Press Res* 2011; 34: 1-11 (doi: 10.1159/000320387)

Drevinge C, Karlsson LO, Stahlman M, Larsson T, Perman Sundelin J, Grip L et al. Cholesteryl esters accumulate in the heart in a porcine model of ischemia and reperfusion. *PLoS One* 2013; 8: e61942 (doi: 10.1371/journal.pone.0061942)

Duncan JG. Lipotoxicity: what is the fate of fatty acids? *J Lipid Res* 2008; 49: 1375-1376 (doi: 10.1194/jlr.E800010-JLR200)

Durante A, Peretto G, Laricchia A, Ancona F, Spartera M, Mangieri A et al. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 981-1004 (doi: 10.2174/138161212799436467)

Dzau VJ. Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. *Am J Cardiol* 1987; 59: 59A-65A (doi: 10.1016/0002-9149(87)90178-0)

Dzau VJ. Cardiac renin-angiotensin system. Molecular and functional aspects. *Am J Med* 1988; 84: 22-27 (doi: 10.1016/0002-9343(88)90201-x)

Dzau VJ, Ellison KE, Brody T, Ingelfinger J, Pratt RE. A comparative study of the distributions of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acids in rat and mouse tissues. *Endocrinology* 1987; 120: 2334-2338 (doi: 10.1210/endo-120-6-2334)

Eickhoff MK, Dekkers CCJ, Kramers BJ, Laverman GD, Frimodt-Moller M, Jorgensen NR et al. Effects of Dapagliflozin on Volume Status When Added to Renin-Angiotensin System Inhibitors. *J Clin Med* 2019; 8: (doi: 10.3390/jcm8060779)

Endo-Mochizuki Y, Mochizuki N, Sawa H, Takada A, Okamoto H, Kawaguchi H et al. Expression of renin and angiotensin-converting enzyme in human hearts. *Heart Vessels* 1995; 10: 285-293 (doi: 10.1007/bf02911386)

Engeli S, Bohnke J, Gorzelniak K, Janke J, Schling P, Bader M et al. Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension* 2005; 45: 356-362 (doi: 10.1161/01.HYP.0000154361.47683.d3)

Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Aros F et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N Engl J Med* 2018; 378: e34 (doi: 10.1056/NEJMoa1800389)

Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Aros F et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* 2013; 368: 1279-1290 (doi: 10.1056/NEJMoa1200303)

Fang CX, Dong F, Thomas DP, Ma H, He L, Ren J. Hypertrophic cardiomyopathy in high-fat diet-induced obesity: role of suppression of forkhead transcription factor and atrophy gene transcription. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295: H1206-H1215 (doi: 10.1152/ajpheart.00319.2008)

Ferrario CM. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension* 2006; 47: 515-521 (doi: 10.1161/01.HYP.0000196268.08909.fb)

Filippatos TD, Lontos A, Papakitsou I, Elisaf MS. SGLT2 inhibitors and cardioprotection: a matter of debate and multiple hypotheses. *Postgrad Med* 2019; 131: 82-88 (doi: 10.1080/00325481.2019.1581971)

Fitchett D, Inzucchi SE, Cannon CP, McGuire DK, Scirica BM, Johansen OE et al. Empagliflozin Reduced Mortality and Hospitalization for Heart Failure Across the Spectrum of Cardiovascular Risk in the EMPA-REG OUTCOME Trial. *Circulation* 2019; 139: 1384-1395 (doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037778)

Foldes G, Vajda S, Lako-Futo Z, Sarman B, Skoumal R, Ilves M et al. Distinct modulation of angiotensin II-induced early left ventricular hypertrophic gene programming by dietary fat type. *J Lipid Res* 2006; 47: 1219-1226 (doi: 10.1194/jlr.M500550-JLR200)

Frantz ED, Penna-de-Carvalho A, Batista Tde M, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Comparative effects of the renin-angiotensin system blockers on nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance in C57BL/6 mice. *Metab Syndr Relat Disord* 2014; 12: 191-201 (doi: 10.1089/met.2013.0129)

- Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 46: 212-223 (doi: 10.3164/jcbn.09-83)
- Gallagher PE, Ferrario CM, Tallant EA. MAP kinase/phosphatase pathway mediates the regulation of ACE2 by angiotensin peptides. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295: C1169-1174 (doi: 10.1152/ajpcell.00145.2008)
- Gallo LA, Ward MS, Fotheringham AK, Zhuang A, Borg DJ, Flemming NB et al. Once daily administration of the SGLT2 inhibitor, empagliflozin, attenuates markers of renal fibrosis without improving albuminuria in diabetic db/db mice. *Sci Rep* 2016; 6: 26428 (doi: 10.1038/srep26428)
- Ganten D, Minnich JL, Granger P, Hayduk K, Brecht HM, Barbeau A et al. Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. *Science* 1971; 173: 64-65 (doi: 10.1126/science.173.3991.64)
- Ge Y, Li G, Liu B, Guo H, Wang D, Jie Q et al. The Protective Effect of Lacidipine on Myocardial Remodeling Is Mediated by the Suppression in Expression of GPR78 and CHOP in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015; 2015: 945076 (doi: 10.1155/2015/945076)
- Gembardt F, Bartaun C, Jarzebska N, Mayoux E, Todorov VT, Hohenstein B et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin ameliorates early features of diabetic nephropathy in BTBR ob/ob type 2 diabetic mice with and without hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 307: F317-325 (doi: 10.1152/ajprenal.00145.2014)
- Gillingham LG, Harris-Janz S, Jones PJ. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *Lipids* 2011; 46: 209-228 (doi: 10.1007/s11745-010-3524-y)
- Giugliano D, Maiorino MI, Bellastella G, Esposito K. Glycemic control in type 2 diabetes: from medication nonadherence to residual vascular risk. *Endocrine* 2018; 61: 23-27 (doi: 10.1007/s12020-017-1517-9)
- Gomez RA, Sequeira-Lopez MLS. Renin cells in homeostasis, regeneration and immune defence mechanisms. *Nat Rev Nephrol* 2018; 14: 231-245 (doi: 10.1038/nrneph.2017.186)
- Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1993; 87: 1816-1828 (doi: 10.1161/01.cir.87.6.1816)
- Grimsgaard S, Bonna KH, Jacobsen BK, Bjerve KS. Plasma saturated and linoleic fatty acids are independently associated with blood pressure. *Hypertension* 1999; 34: 478-483 (doi: 10.1161/01.hyp.34.3.478)
- Groenendyk J, Agellon LB, Michalak M. Coping with endoplasmic reticulum stress in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 2013; 75: 49-67 (doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183707)
- Groenendyk J, Sreenivasiah PK, Kim DH, Agellon LB, Michalak M. Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ Res* 2010; 107: 1185-1197 (doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227033)

Guan HS, Shangguan HJ, Shang Z, Yang L, Meng XM, Qiao SB. Endoplasmic reticulum stress caused by left ventricular hypertrophy in rats: effects of telmisartan. *Am J Med Sci* 2011; 342: 318-323 (doi: 10.1097/MAJ.0b013e3182112baf)

Guan YZ, Yin RX, Zheng PF, Deng GX, Liu CX, Wei BL. Potential molecular mechanism of ACE gene at different time points in STEMI patients based on genome-wide microarray dataset. *Lipids Health Dis* 2019; 18: 184 (doi: 10.1186/s12944-019-1131-3)

Guasch-Ferre M, Babio N, Martinez-Gonzalez MA, Corella D, Ros E, Martin-Pelaez S et al. Dietary fat intake and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality in a population at high risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2015; 102: 1563-1573 (doi: 10.3945/ajcn.115.116046)

Gueant JL, Elakoum R, Ziegler O, Coelho D, Feigerlova E, Daval JL et al. Nutritional models of foetal programming and nutrigenomic and epigenomic dysregulations of fatty acid metabolism in the liver and heart. *Pflugers Arch* 2014; 466: 833-850 (doi: 10.1007/s00424-013-1339-4)

Han J, Kaufman RJ. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *J Lipid Res* 2016; 57: 1329-1338 (doi: 10.1194/jlr.R067595)

He Z, Zhang X, Chen C, Wen Z, Hoopes SL, Zeldin DC et al. Cardiomyocyte-specific expression of CYP2J2 prevents development of cardiac remodelling induced by angiotensin II. *Cardiovasc Res* 2015; 105: 304-317 (doi: 10.1093/cvr/cvv018)

Heerspink HJ, Perkins BA, Fitchett DH, Husain M, Cherney DZ. Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitors in the Treatment of Diabetes Mellitus: Cardiovascular and Kidney Effects, Potential Mechanisms, and Clinical Applications. *Circulation* 2016; 134: 752-772 (doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021887)

Heise T, Jordan J, Wanner C, Heer M, Macha S, Mattheus M et al. Pharmacodynamic Effects of Single and Multiple Doses of Empagliflozin in Patients With Type 2 Diabetes. *Clin Ther* 2016; 38: 2265-2276 (doi: 10.1016/j.clinthera.2016.09.001)

Hellmann W, Suzuki F, Ohkubo H, Nakanishi S, Ludwig G, Ganten D. Angiotensinogen gene expression in extrahepatic rat tissues: application of a solution hybridization assay. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1988; 338: 327-331 (doi: 10.1007/bf00173408)

Home P. Cardiovascular outcome trials of glucose-lowering medications: an update. *Diabetologia* 2019; 62: 357-369 (doi: 10.1007/s00125-018-4801-1)

Hosokawa K, Takata T, Sugihara T, Matono T, Koda M, Kanda T et al. Ipragliflozin Ameliorates Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis through Preventing Ectopic Lipid Deposition in Renal Tubules. *Int J Mol Sci* 2019; 21: (doi: 10.3390/ijms21010190)

Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 2010; 140: 900-917 (doi: 10.1016/j.cell.2010.02.034)

Houston DK, Ding J, Lee JS, Garcia M, Kanaya AM, Tylavsky FA et al. Dietary fat and cholesterol and risk of cardiovascular disease in older adults: the Health ABC Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011; 21: 430-437 (doi: 10.1016/j.numecd.2009.11.007)

Houston M. The relationship of saturated fats and coronary heart disease: fa(c)t or fiction? A commentary. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2018; 12: 33-37 (doi: 10.1177/1753944717742549)

Hsu HC, Liu CH, Tsai YC, Li SJ, Chen CY, Chu CH et al. Time-dependent cellular response in the liver and heart in a dietary-induced obese mouse model: the potential role of ER stress and autophagy. *Eur J Nutr* 2016; 55: 2031-2043 (doi: 10.1007/s00394-015-1017-8)

Htay T, Soe K, Lopez-Perez A, Doan AH, Romagosa MA, Aung K. Mortality and Cardiovascular Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Curr Cardiol Rep* 2019; 21: 45 (doi: 10.1007/s11886-019-1133-9)

Hummel CS, Lu C, Loo DD, Hirayama BA, Voss AA, Wright EM. Glucose transport by human renal Na⁺/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 300: C14-21 (doi: 10.1152/ajpcell.00388.2010)

Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 953-970 (doi: 10.1210/me.2004-0536)

Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E, Jr., Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Circulation* 2001; 104: 346-351 (doi: 10.1161/01.cir.104.3.346)

Iuchi H, Sakamoto M, Matsutani D, Suzuki H, Kayama Y, Takeda N et al. Time-dependent effects of ipragliflozin on behaviour and energy homeostasis in normal and type 2 diabetic rats: continuous glucose telemetry analysis. *Sci Rep* 2017; 7: 11906 (doi: 10.1038/s41598-017-12106-y)

Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, Ard JD, Comuzzie AG, Donato KA et al. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63: 2985-3023 (doi: 10.1016/j.jacc.2013.11.004)

Jia G, Habibi J, Bostick BP, Ma L, DeMarco VG, Aroor AR et al. Uric acid promotes left ventricular diastolic dysfunction in mice fed a Western diet. *Hypertension* 2015; 65: 531-539 (doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04737)

Jin N, Wang Y, Liu L, Xue F, Jiang T, Xu M. Dysregulation of the Renin-Angiotensin System and Cardiometabolic Status in Mice Fed a Long-Term High-Fat Diet. *Med Sci Monit* 2019; 25: 6605-6614 (doi: 10.12659/MSM.914877)

Johren O, Dendorfer A, Dominiak P. Cardiovascular and renal function of angiotensin II type-2 receptors. *Cardiovasc Res* 2004; 62: 460-467 (doi: 10.1016/j.cardiores.2004.01.011)

Joseph P, Leong D, McKee M, Anand SS, Schwalm JD, Teo K et al. Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1: The Epidemiology and Risk Factors. *Circ Res* 2017; 121: 677-694 (doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.308903)

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: 419-437 (doi: 10.1007/s10741-017-9665-9)

Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F et al. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation* 2008; 118: 2523-2532 (doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.784868)

Katada J, Majima M. AT(2) receptor-dependent vasodilation is mediated by activation of vascular kinin generation under flow conditions. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 484-491 (doi: 10.1038/sj.bjp.0704731)

Katwa LC, Ratajska A, Cleutjens JP, Sun Y, Zhou G, Lee SJ et al. Angiotensin converting enzyme and kininase-II-like activities in cultured valvular interstitial cells of the rat heart. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 57-64

Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2402-2410 (doi: 10.1210/jcem.85.7.6661)

Kelly DP, Strauss AW. Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med* 1994; 330: 913-919 (doi: 10.1056/NEJM199403313301308)

Keys A. Prediction and possible prevention of coronary disease. *Am J Public Health Nations Health* 1953; 43: 1399-1407 (doi: 10.2105/ajph.43.11.1399)

Keys A. Diet and the epidemiology of coronary heart disease. *J Am Med Assoc* 1957; 164: 1912-1919 (doi: 10.1001/jama.1957.62980170024007e)

Keys A. Coronary heart disease in seven countries. 1970. *Nutrition* 1997; 13: 250-252; discussion 249, 253 (doi: 10.1016/s0899-9007(96)00410-8)

Kimura T, Nakamura K, Miyoshi T, Yoshida M, Akazawa K, Saito Y et al. Inhibitory Effects of Tofogliflozin on Cardiac Hypertrophy in Dahl Salt-Sensitive and Salt-Resistant Rats Fed a High-Fat Diet. *Int Heart J* 2019; 60: 728-735 (doi: 10.1536/ihj.18-392)

Koch-Weser J. Nature of the Inotropic Action of Angiotensin on Ventricular Myocardium. *Circ Res* 1965; 16: 230-237 (doi: 10.1161/01.res.16.3.230)

Konstantinov IE, Jankovic GM, Alexander I, Ignatowski: a pioneer in the study of atherosclerosis. *Tex Heart Inst J* 2013; 40: 246-249

Kremmyda LS, Tvrzicka E, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2011; 155: 195-218 (doi: 10.5507/bp.2011.052)

Kromhout D, Menotti A, Bloemberg B, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R et al. Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Prev Med* 1995; 24: 308-315 (doi: 10.1006/pmed.1995.1049)

Kunikullaya UK, Ananthakrishnan V, Goturu J. Robert Tigerstedt and the discovery of renin - a revisit. *Int J Cardiol* 2012; 158: 1-5 (doi: 10.1016/j.ijcard.2011.11.013)

Kuriyama S. Protection of the kidney with sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: potential mechanisms raised by the large-scaled randomized control trials. *Clin Exp Nephrol* 2019; 23: 304-312 (doi: 10.1007/s10157-018-1673-0)

Kusaka H, Koibuchi N, Hasegawa Y, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Empagliflozin lessened cardiac injury and reduced visceral adipocyte hypertrophy in prediabetic rats with metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol* 2016; 15: 157 (doi: 10.1186/s12933-016-0473-7)

Lahnwong S, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Potential mechanisms responsible for cardioprotective effects of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors. *Cardiovasc Diabetol* 2018; 17: 101 (doi: 10.1186/s12933-018-0745-5)

Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 2007; 22: 193-201 (doi: 10.1152/physiol.00050.2006)

Lee HC, Shiou YL, Jhuo SJ, Chang CY, Liu PL, Jhuang WJ et al. The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin attenuates cardiac fibrosis and improves ventricular hemodynamics in hypertensive heart failure rats. *Cardiovasc Diabetol* 2019; 18: 45 (doi: 10.1186/s12933-019-0849-6)

Lee YJ, Han HJ. Regulatory mechanisms of Na(+)/glucose cotransporters in renal proximal tubule cells. *Kidney Int Suppl* 2007; (*em impressão*, doi: 10.1038/sj.ki.5002383): S27-35 (doi: 10.1038/sj.ki.5002383)

Lee YT, Laxton V, Lin HY, Chan YWF, Fitzgerald-Smith S, To TLO et al. Animal models of atherosclerosis. *Biomed Rep* 2017; 6: 259-266 (doi: 10.3892/br.2017.843)

Leng W, Ouyang X, Lei X, Wu M, Chen L, Wu Q et al. The SGLT-2 Inhibitor Dapagliflozin Has a Therapeutic Effect on Atherosclerosis in Diabetic ApoE(-/-) Mice. *Mediators Inflamm* 2016; 2016: 6305735 (doi: 10.1155/2016/6305735)

Ley SH, Hamdy O, Mohan V, Hu FB. Prevention and management of type 2 diabetes: dietary components and nutritional strategies. *Lancet* 2014; 383: 1999-2007 (doi: 10.1016/S0140-6736(14)60613-9)

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 (doi: 10.1186/s12933-019-0816-2)

Li CJ, Lv L, Li H, Yu DM. Cardiac fibrosis and dysfunction in experimental diabetic cardiomyopathy are ameliorated by alpha-lipoic acid. *Cardiovasc Diabetol* 2012; 11: 73 (doi: 10.1186/1475-2840-11-73)

Li L, Konishi Y, Morikawa T, Zhang Y, Kitabayashi C, Kobara H et al. Effect of a SGLT2 inhibitor on the systemic and intrarenal renin-angiotensin system in subtotaly nephrectomized rats. *J Pharmacol Sci* 2018a; 137: 220-223 (doi: 10.1016/j.jphs.2017.10.006)

Li T, Jiang S, Lu C, Hu W, Ji T, Han M et al. Snapshots: Endoplasmic Reticulum Stress in Lipid Metabolism and Cardiovascular Disease. *Curr Issues Mol Biol* 2018b; 28: 14-28 (doi: 10.21775/cimb.028.014)

Li X, Wang Y, Wang H, Huang C, Huang Y, Li J. Endoplasmic reticulum stress is the crossroads of autophagy, inflammation, and apoptosis signaling pathways and participates in liver fibrosis. *Inflamm Res* 2015; 64: 1-7 (doi: 10.1007/s00011-014-0772-y)

Liang P, Jones CA, Bisgrove BW, Song L, Glenn ST, Yost HJ et al. Genomic characterization and expression analysis of the first nonmammalian renin genes from zebrafish and pufferfish. *Physiol Genomics* 2004; 16: 314-322 (doi: 10.1152/physiolgenomics.00012.2003)

Lima VM, Lino CA, Senger N, de Oliveira Silva T, Fonseca RIB, Bader M et al. Angiotensin II type 2 receptor mediates high fat diet-induced cardiomyocyte hypertrophy and hypercholesterolemia. *Mol Cell Endocrinol* 2019; 498: 110576 (doi: 10.1016/j.mce.2019.110576)

Lin B, Koibuchi N, Hasegawa Y, Sueta D, Toyama K, Uekawa K et al. Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol* 2014; 13: 148 (doi: 10.1186/s12933-014-0148-1)

Lin L, Liu X, Xu J, Weng L, Ren J, Ge J et al. Mas receptor mediates cardioprotection of angiotensin-(1-7) against Angiotensin II-induced cardiomyocyte autophagy and cardiac remodelling through inhibition of oxidative stress. *J Cell Mol Med* 2016; 20: 48-57 (doi: 10.1111/jcmm.12687)

Liu CW, Chen KH, Tseng CK, Chang WC, Wu YW, Hwang JJ. The dose-response effects of uric acid on the prevalence of metabolic syndrome and electrocardiographic left ventricular hypertrophy in healthy individuals. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2019; 29: 30-38 (doi: 10.1016/j.numecd.2018.10.001)

Liu J, Wang P, Zou L, Qu J, Litovsky S, Umeda P et al. High-fat, low-carbohydrate diet promotes arrhythmic death and increases myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014; 307: H598-608 (doi: 10.1152/ajpheart.00058.2014)

Longhi R, Almeida RF, Pettenuzzo LF, Souza DG, Machado L, Quincozes-Santos A et al. Effect of a trans fatty acid-enriched diet on mitochondrial, inflammatory, and oxidative stress parameters in the cortex and hippocampus of Wistar rats. *Eur J Nutr* 2018; 57: 1913-1924 (doi: 10.1007/s00394-017-1474-3)

Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3: (doi: 10.1101/cshperspect.a005058)

Ludwig DS, Hu FB, Tappy L, Brand-Miller J. Dietary carbohydrates: role of quality and quantity in chronic disease. *BMJ* 2018; 361: k2340 (doi: 10.1136/bmj.k2340)

Macedo LM, Souza AP, De Maria ML, Borges CL, Soares CM, Pedrino GR et al. Cardioprotective effects of diminazene aceturate in pressure-overloaded rat hearts. *Life Sci* 2016; 155: 63-69 (doi: 10.1016/j.lfs.2016.04.036)

Maloberti A, Giannattasio C, Bombelli M, Desideri G, Cicero AFG, Muiesan ML et al. Hyperuricemia and Risk of Cardiovascular Outcomes: The Experience of the URRAH (Uric Acid Right for Heart Health) Project. *High Blood Press Cardiovasc Prev* 2020; (*em impressão*, doi: 10.1007/s40292-020-00368-z): (doi: 10.1007/s40292-020-00368-z)

Mancia G, Grassi G, Borghi C. Hyperuricemia, urate deposition and the association with hypertension. *Curr Med Res Opin* 2015; 31 Suppl 2: 15-19 (doi: 10.1185/03007995.2015.1087981)

Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003; 75: 469-486 (doi: 10.1590/s0001-37652003000400006)

Martinez-Pizarro A, Desviat LR, Ugarte M, Perez B, Richard E. Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Homocystinuria Patients with Remethylation Defects. *PLoS One* 2016; 11: e0150357 (doi: 10.1371/journal.pone.0150357)

Mascolo A, Urbanek K, De Angelis A, Sessa M, Scavone C, Berrino L et al. Angiotensin II and angiotensin 1-7: which is their role in atrial fibrillation? *Heart Fail Rev* 2019; (*em impressão*, doi: 10.1007/s10741-019-09837-7): (doi: 10.1007/s10741-019-09837-7)

Matsumoto Y, Park IK, Kohyama K. Matrix metalloproteinase (MMP)-9, but not MMP-2, is involved in the development and progression of C protein-induced myocarditis and subsequent dilated cardiomyopathy. *J Immunol* 2009; 183: 4773-4781 (doi: 10.4049/jimmunol.0900871)

McGuire S. U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services, Dietary Guidelines for Americans, 2010. 7th Edition, Washington, DC: U.S. Government Printing Office, January 2011. *Adv Nutr* 2011; 2: 293-294 (doi: 10.3945/an.111.000430)

Meikle PJ, Summers SA. Sphingolipids and phospholipids in insulin resistance and related metabolic disorders. *Nat Rev Endocrinol* 2017; 13: 79-91 (doi: 10.1038/nrendo.2016.169)

Menikdiwela KR, Ramalingam L, Allen L, Scoggin S, Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. Angiotensin II Increases Endoplasmic Reticulum Stress in Adipose Tissue and Adipocytes. *Sci Rep* 2019; 9: 8481 (doi: 10.1038/s41598-019-44834-8)

Mialet-Perez J, Vindis C. Autophagy in health and disease: focus on the cardiovascular system. *Essays Biochem* 2017; 61: 721-732 (doi: 10.1042/EBC20170022)

Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res* 2010; 107: 1071-1082 (doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227819)

Mizuno M, Kuno A, Yano T, Miki T, Oshima H, Sato T et al. Empagliflozin normalizes the size and number of mitochondria and prevents reduction in mitochondrial size after myocardial infarction in diabetic hearts. *Physiol Rep* 2018; 6: e13741 (doi: 10.14814/phy2.13741)

Moniwa N, Varagic J, Ahmad S, VonCannon JL, Simington SW, Wang H et al. Hemodynamic and hormonal changes to dual renin-angiotensin system inhibition in experimental hypertension. *Hypertension* 2013; 61: 417-424 (doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.201889)

Munoz A, Costa M. Nutritionally mediated oxidative stress and inflammation. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 610950 (doi: 10.1155/2013/610950)

Murugan D, Lau YS, Lau CW, Mustafa MR, Huang Y. Angiotensin 1-7 Protects against Angiotensin II-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Endothelial Dysfunction via Mas Receptor. *PLoS One* 2015; 10: e0145413 (doi: 10.1371/journal.pone.0145413)

Muskiet MH, van Raalte DH, van Bommel EJ, Smits MM, Tonneijck L. Understanding EMPA-REG OUTCOME. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015; 3: 928-929 (doi: 10.1016/S2213-8587(15)00424-6)

Nakayama A, Morita H, Nakao T, Yamaguchi T, Sumida T, Ikeda Y et al. A Food-Derived Flavonoid Luteolin Protects against Angiotensin II-Induced Cardiac Remodeling. *PLoS One* 2015; 10: e0137106 (doi: 10.1371/journal.pone.0137106)

Natali A, Nesti L, Fabiani I, Calogero E, Di Bello V. Impact of empagliflozin 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. *Cardiovasc Diabetol* 2017; 16: 130 (doi: 10.1186/s12933-017-0615-6)

Nettleton JA, Lovegrove JA, Mensink RP, Schwab U. Dietary Fatty Acids: Is it Time to Change the Recommendations? *Ann Nutr Metab* 2016; 68: 249-257 (doi: 10.1159/000446865)

Niakouei A, Tehrani M, Fulton L. Health Disparities and Cardiovascular Disease. *Healthcare (Basel)* 2020; 8: (doi: 10.3390/healthcare8010065)

Ochoa CD, Wu RF, Terada LS. ROS signaling and ER stress in cardiovascular disease. *Mol Aspects Med* 2018; 63: 18-29 (doi: 10.1016/j.mam.2018.03.002)

Oelze M, Kroller-Schon S, Welschof P, Jansen T, Hausding M, Mikhed Y et al. The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin improves diabetes-induced vascular dysfunction in the streptozotocin diabetes rat model by interfering with oxidative stress and glucotoxicity. *PLoS One* 2014; 9: e112394 (doi: 10.1371/journal.pone.0112394)

Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Tsukamoto O, Takashima S et al. Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation* 2004; 110: 705-712 (doi: 10.1161/01.CIR.0000137836.95625.D4)

Otaki Y, Watanabe T, Kinoshita D, Yokoyama M, Takahashi T, Toshima T et al. Association of plasma xanthine oxidoreductase activity with severity and clinical outcome in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2017; 228: 151-157 (doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.077)

Padda RS, Shi Y, Lo CS, Zhang SL, Chan JS. Angiotensin-(1-7): A Novel Peptide to Treat Hypertension and Nephropathy in Diabetes? *J Diabetes Metab* 2015; 6: (doi: 10.4172/2155-6156.1000615)

Page IH, Helmer OM. A Crystalline Pressor Substance (Angiotonin) Resulting from the Reaction between Renin and Renin-Activator. *J Exp Med* 1940; 71: 29-42 (doi: 10.1084/jem.71.1.29)

Page IH, Stare FJ, Corcoran AC, Pollack H, Wilkinson CF, Jr. Atherosclerosis and the fat content of the diet. *Circulation* 1957; 16: 163-178 (doi: 10.1161/01.cir.16.2.163)

Pan A, Lin X, Hemler E, Hu FB. Diet and Cardiovascular Disease: Advances and Challenges in Population-Based Studies. *Cell Metab* 2018; 27: 489-496 (doi: 10.1016/j.cmet.2018.02.017)

Panchapakesan U, Pegg K, Gross S, Komala MG, Mudaliar H, Forbes J et al. Effects of SGLT2 inhibition in human kidney proximal tubular cells--renoprotection in diabetic nephropathy? *PLoS One* 2013; 8: e54442 (doi: 10.1371/journal.pone.0054442)

Pancholia AK. Sodium-glucose cotransporter-2 inhibition for the reduction of cardiovascular events in high-risk patients with diabetes mellitus. *Indian Heart J* 2018; 70: 915-921 (doi: 10.1016/j.ihj.2018.08.022)

Peach MJ, Dostal DE. The angiotensin II receptor and the actions of angiotensin II. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 16 Suppl 4: S25-30 (doi: 10.1097/00005344-199016004-00007)

Pereira MJ, Eriksson JW. Emerging Role of SGLT-2 Inhibitors for the Treatment of Obesity. *Drugs* 2019; 79: 219-230 (doi: 10.1007/s40265-019-1057-0)

Perman JC, Bostrom P, Lindbom M, Lidberg U, StAhlman M, Hagg D et al. The VLDL receptor promotes lipotoxicity and increases mortality in mice following an acute myocardial infarction. *J Clin Invest* 2011; 121: 2625-2640 (doi: 10.1172/JCI43068)

Petito-da-Silva TI, Souza-Mello V, Barbosa-da-Silva S. Empaglifozin mitigates NAFLD in high-fat-fed mice by alleviating insulin resistance, lipogenesis and ER stress. *Mol Cell Endocrinol* 2019; 498: 110539 (doi: 10.1016/j.mce.2019.110539)

Phillips MI, de Oliveira EM. Brain renin angiotensin in disease. *J Mol Med (Berl)* 2008; 86: 715-722 (doi: 10.1007/s00109-008-0331-5)

Piazza G, Goldhaber SZ, Kroll A, Goldberg RJ, Emery C, Spencer FA. Venous thromboembolism in patients with diabetes mellitus. *Am J Med* 2012; 125: 709-716 (doi: 10.1016/j.amjmed.2011.12.004)

Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 2006; 113: 898-918 (doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.171016)

Pulinilkunnil T, Kienesberger PC, Nagendran J, Waller TJ, Young ME, Kershaw EE et al. Myocardial adipose triglyceride lipase overexpression protects diabetic mice from the development of lipotoxic cardiomyopathy. *Diabetes* 2013; 62: 1464-1477 (doi: 10.2337/db12-0927)

Qi Y, Zhang J, Cole-Jeffrey CT, Shenoy V, Espejo A, Hanna M et al. Diminazene aceturate enhances angiotensin-converting enzyme 2 activity and attenuates ischemia-induced cardiac pathophysiology. *Hypertension* 2013; 62: 746-752 (doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01337)

Rajasekaran H, Lytvyn Y, Cherney DZ. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibition and cardiovascular risk reduction in patients with type 2 diabetes: the emerging role of natriuresis. *Kidney Int* 2016; 89: 524-526 (doi: 10.1016/j.kint.2015.12.038)

Ravera A, Carubelli V, Sciatti E, Bonadei I, Gorga E, Cani D et al. Nutrition and Cardiovascular Disease: Finding the Perfect Recipe for Cardiovascular Health. *Nutrients* 2016; 8: (doi: 10.3390/nu8060363)
Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123: 1939-1951 (doi: 10.1093/jn/123.11.1939)

Reyes-Pardo H, Bautista R, Vargas-Robles H, Rios A, Sanchez D, Escalante B. Role of sodium/glucose cotransporter inhibition on a rat model of angiotensin II-dependent kidney damage. *BMC Nephrol* 2019; 20: 292 (doi: 10.1186/s12882-019-1490-z)

Reynolds A, Mann J, Cummings J, Winter N, Mete E, Te Morenga L. Carbohydrate quality and human health: a series of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet* 2019; 393: 434-445 (doi: 10.1016/S0140-6736(18)31809-9)

Riaz S, Zeidan A, Mraiche F. Myocardial proteases and cardiac remodeling. *J Cell Physiol* 2017; 232: 3244-3250 (doi: 10.1002/jcp.25884)

Ribeiro AL, Duncan BB, Brant LC, Lotufo PA, Mill JG, Barreto SM. Cardiovascular Health in Brazil: Trends and Perspectives. *Circulation* 2016; 133: 422-433 (doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008727)

Rogers TB, Gaa ST, Allen IS. Identification and characterization of functional angiotensin II receptors on cultured heart myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 236: 438-444

Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol* 2017; 70: 1-25 (doi: 10.1016/j.jacc.2017.04.052)

Ruparelia N, Chai JT, Fisher EA, Choudhury RP. Inflammatory processes in cardiovascular disease: a route to targeted therapies. *Nat Rev Cardiol* 2017; 14: 314 (doi: 10.1038/nrcardio.2017.33)

Ruwhof C, van der Laarse A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 23-37 (doi: 10.1016/s0008-6363(00)00076-6)

Sacks FM, Lichtenstein AH, Wu JHY, Appel LJ, Creager MA, Kris-Etherton PM et al. Dietary Fats and Cardiovascular Disease: A Presidential Advisory From the American Heart Association. *Circulation* 2017; 136: e1-e23 (doi: 10.1161/CIR.0000000000000510)

Salazar G. NADPH Oxidases and Mitochondria in Vascular Senescence. *Int J Mol Sci* 2018; 19: (doi: 10.3390/ijms19051327)

Salvador JM, Brown-Clay JD, Fornace AJ, Jr. Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 2013; 793: 1-19 (doi: 10.1007/978-1-4614-8289-5_1)

Santilli F, D'Ardes D, Guagnano MT, Davi G. Metabolic Syndrome: Sex-Related Cardiovascular Risk and Therapeutic Approach. *Curr Med Chem* 2017; 24: 2602-2627 (doi: 10.2174/0929867324666170710121145)

Santos RA, Castro CH, Gava E, Pinheiro SV, Almeida AP, Paula RD et al. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension* 2006; 47: 996-1002 (doi: 10.1161/01.HYP.0000215289.51180.5c)

Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8258-8263 (doi: 10.1073/pnas.1432869100)

Santos RD, Gagliardi AC, Xavier HT, Magnoni CD, Cassani R, Lottenberg AM et al. [First guidelines on fat consumption and cardiovascular health]. *Arq Bras Cardiol* 2013; 100: 1-40

Scheen AJ. Pharmacodynamics, efficacy and safety of sodium-glucose co-transporter type 2 (SGLT2) inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2015; 75: 33-59 (doi: 10.1007/s40265-014-0337-y)

Schluter KD, Wenzel S. Angiotensin II: a hormone involved in and contributing to pro-hypertrophic cardiac networks and target of anti-hypertrophic cross-talks. *Pharmacol Ther* 2008; 119: 311-325 (doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.05.010)

Schwaiger E, Burghart L, Signorini L, Ristl R, Kopecky C, Tura A et al. Empagliflozin in posttransplantation diabetes mellitus: A prospective, interventional pilot study on glucose metabolism, fluid volume, and patient safety. *Am J Transplant* 2019; 19: 907-919 (doi: 10.1111/ajt.15223)

Sechi LA, Griffin CA, Grady EF, Kalinyak JE, Schambelan M. Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. *Circ Res* 1992; 71: 1482-1489 (doi: 10.1161/01.res.71.6.1482)

- Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E, Jr., Gaffney FA, Inagami T. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin Invest* 2000; 106: R25-29 (doi: 10.1172/JCI10037)
- Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* 2002; 3: 99-111
- Shin SJ, Chung S, Kim SJ, Lee EM, Yoo YH, Kim JW et al. Effect of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor, Dapagliflozin, on Renal Renin-Angiotensin System in an Animal Model of Type 2 Diabetes. *PLoS One* 2016; 11: e0165703 (doi: 10.1371/journal.pone.0165703)
- Shubrook JH, Bokaie BB, Adkins SE. Empagliflozin in the treatment of type 2 diabetes: evidence to date. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9: 5793-5803 (doi: 10.2147/DDDT.S69926)
- Silva Dos Santos D, Polidoro JZ, Borges-Junior FA, Girardi ACC. Cardioprotection conferred by sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: a renal proximal tubule perspective. *Am J Physiol Cell Physiol* 2020; 318: C328-C336 (doi: 10.1152/ajpcell.00275.2019)
- Singh S, Bhat J, Wang PH. Cardiovascular effects of anti-diabetic medications in type 2 diabetes mellitus. *Curr Cardiol Rep* 2013; 15: 327 (doi: 10.1007/s11886-012-0327-1)
- Sjostrom CD, Hashemi M, Sugg J, Ptaszynska A, Johnsson E. Dapagliflozin-induced weight loss affects 24-week glycated haemoglobin and blood pressure levels. *Diabetes Obes Metab* 2015; 17: 809-812 (doi: 10.1111/dom.12500)
- Skeggs LT, Jr., Marsh WH, Kahn JR, Shumway NP. The existence of two forms of hypertensin. *J Exp Med* 1954; 99: 275-282 (doi: 10.1084/jem.99.3.275)
- Steckelings UM, Rompe F, Kaschina E, Unger T. The evolving story of the RAAS in hypertension, diabetes and CV disease: moving from macrovascular to microvascular targets. *Fundam Clin Pharmacol* 2009; 23: 693-703 (doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00780.x)
- Steven S, Oelze M, Hanf A, Kroller-Schon S, Kashani F, Roohani S et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves the primary diabetic complications in ZDF rats. *Redox Biol* 2017; 13: 370-385 (doi: 10.1016/j.redox.2017.06.009)
- Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 651-657 (doi: 10.1172/JCI117710)
- Sverdlov AL, Elezaby A, Qin F, Behring JB, Luptak I, Calamaras TD et al. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Mediate Cardiac Structural, Functional, and Mitochondrial Consequences of Diet-Induced Metabolic Heart Disease. *J Am Heart Assoc* 2016; 5: (doi: 10.1161/JAHA.115.002555)
- Tahara A, Kurosaki E, Yokono M, Yamajuku D, Kihara R, Hayashizaki Y et al. Effects of sodium-glucose cotransporter 2 selective inhibitor ipragliflozin on hyperglycaemia, oxidative stress, inflammation and liver injury in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *J Pharm Pharmacol* 2014; 66: 975-987 (doi: 10.1111/jphp.12223)
- Takasu T, Takakura S. Effect of ipragliflozin, an SGLT2 inhibitor, on cardiac histopathological changes in a non-diabetic rat model of cardiomyopathy. *Life Sci* 2019; 230: 19-27 (doi: 10.1016/j.lfs.2019.05.051)

- Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H1560-1566 (doi: 10.1152/ajpheart.00941.2004)
- Tamaya-Mori N, Uemura K, Iguchi A. Gender differences in the dietary lard-induced increase in blood pressure in rats. *Hypertension* 2002; 39: 1015-1020 (doi: 10.1161/01.hyp.0000016400.21001.05)
- Tardy AL, Morio B, Chardigny JM, Malpuech-Brugere C. Ruminant and industrial sources of trans-fat and cardiovascular and diabetic diseases. *Nutr Res Rev* 2011; 24: 111-117 (doi: 10.1017/S0954422411000011)
- Thakker GD, Frangogiannis NG, Zymek PT, Sharma S, Raya JL, Barger PM et al. Increased myocardial susceptibility to repetitive ischemia with high-fat diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2008; 16: 2593-2600 (doi: 10.1038/oby.2008.414)
- Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000; 275: 33238-33243 (doi: 10.1074/jbc.M002615200)
- Trivedi PC, Bartlett JJ, Perez LJ, Brunt KR, Legare JF, Hassan A et al. Glucolipotoxicity diminishes cardiomyocyte TFEB and inhibits lysosomal autophagy during obesity and diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1861: 1893-1910 (doi: 10.1016/j.bbailip.2016.09.004)
- Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J Am Diet Assoc* 2002; 102: 1621-1630 (doi: 10.1016/s0002-8223(02)90346-9)
- Umpierrez GE, Cantey P, Smiley D, Palacio A, Temponi D, Luster K et al. Primary aldosteronism in diabetic subjects with resistant hypertension. *Diabetes Care* 2007; 30: 1699-1703 (doi: 10.2337/dc07-0031)
- Unger RH. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14: 398-403 (doi: 10.1016/j.tem.2003.09.008)
- Unger T, Ganten D, Lang RE, Scholkens BA. Persistent tissue converting enzyme inhibition following chronic treatment with Hoe498 and MK421 in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985; 7: 36-41 (doi: 10.1097/00005344-198501000-00007)
- Uthman L, Baartscheer A, Schumacher CA, Fiolet JWT, Kuschma MC, Hollmann MW et al. Direct Cardiac Actions of Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitors Target Pathogenic Mechanisms Underlying Heart Failure in Diabetic Patients. *Front Physiol* 2018; 9: 1575 (doi: 10.3389/fphys.2018.01575)
- Vallon V, Thomson SC. Targeting renal glucose reabsorption to treat hyperglycaemia: the pleiotropic effects of SGLT2 inhibition. *Diabetologia* 2017; 60: 215-225 (doi: 10.1007/s00125-016-4157-3)
- van Kesteren CA, Danser AH, Derkx FH, Dekkers DH, Lamers JM, Saxena PR et al. Mannose 6-phosphate receptor-mediated internalization and activation of prorenin by cardiac cells. *Hypertension* 1997; 30: 1389-1396 (doi: 10.1161/01.hyp.30.6.1389)
- Varagic J, Ahmad S, Nagata S, Ferrario CM. ACE2: angiotensin II/angiotensin-(1-7) balance in cardiac and renal injury. *Curr Hypertens Rep* 2014; 16: 420 (doi: 10.1007/s11906-014-0420-5)

- Varagic J, Frohlich ED. Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 1435-1442 (doi: 10.1006/jmcc.2002.2075)
- Verdecchia P, Angeli F, Mazzotta G, Gentile G, Reboldi G. The renin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: role of aliskiren in risk reduction. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4: 971-981 (doi: 10.2147/vhrm.s3215)
- Verma S. Potential Mechanisms of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor-Related Cardiovascular Benefits. *Am J Cardiol* 2019; 124 Suppl 1: S36-S44 (doi: 10.1016/j.amjcard.2019.10.028)
- Verma S, Garg A, Yan AT, Gupta AK, Al-Omran M, Sabongui A et al. Effect of Empagliflozin on Left Ventricular Mass and Diastolic Function in Individuals With Diabetes: An Important Clue to the EMPA-REG OUTCOME Trial? *Diabetes Care* 2016; 39: e212-e213 (doi: 10.2337/dc16-1312)
- Verma S, Mazer CD, Yan AT, Mason T, Garg V, Teoh H et al. Effect of Empagliflozin on Left Ventricular Mass in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Coronary Artery Disease: The EMPA-HEART CardioLink-6 Randomized Clinical Trial. *Circulation* 2019; 140: 1693-1702 (doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.042375)
- Vieira R, Souto SB, Sanchez-Lopez E, Machado AL, Severino P, Jose S et al. Sugar-Lowering Drugs for Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome-Review of Classical and New Compounds: Part-I. *Pharmaceuticals (Basel)* 2019; 12: (doi: 10.3390/ph12040152)
- Walsh-Wilkinson E, Drolet MC, Le Houillier C, Roy EM, Arsenault M, Couet J. Sex differences in the response to angiotensin II receptor blockade in a rat model of eccentric cardiac hypertrophy. *PeerJ* 2019; 7: e7461 (doi: 10.7717/peerj.7461)
- Wang J, Li N, Gao F, Song R, Zhu S, Geng Z. Balance between angiotensin converting enzyme and angiotensin converting enzyme 2 in patients with chronic heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2015; 16: 553-558 (doi: 10.1177/1470320315576257)
- White JR, Jr. Empagliflozin, an SGLT2 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus: a review of the evidence. *Ann Pharmacother* 2015; 49: 582-598 (doi: 10.1177/1060028015573564)
- Woods TC, Satou R, Miyata K, Katsurada A, Dugas CM, Klingenberg NC et al. Canagliflozin Prevents Intrarenal Angiotensinogen Augmentation and Mitigates Kidney Injury and Hypertension in Mouse Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Am J Nephrol* 2019; 49: 331-342 (doi: 10.1159/000499597)
- Wu Y, Yue Y, Fu S, Li Y, Wu D, Lv J et al. Icariside II prevents hypertensive heart disease by alleviating endoplasmic reticulum stress via the PERK/ATF-4/CHOP signalling pathway in spontaneously hypertensive rats. *J Pharm Pharmacol* 2019; 71: 400-407 (doi: 10.1111/jphp.13041)
- Wu Z, Cappiello MG, Scott BB, Bukhtiyarov Y, McGeehan GM. Purification and characterization of recombinant human renin for X-ray crystallization studies. *BMC Biochem* 2008; 9: 19 (doi: 10.1186/1471-2091-9-19)
- Wysocki J, Ye M, Rodriguez E, Gonzalez-Pacheco FR, Barrios C, Evora K et al. Targeting the degradation of angiotensin II with recombinant angiotensin-converting enzyme 2: prevention of angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension* 2010; 55: 90-98 (doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138420)

- Xi XP, Graf K, Goetze S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 73-82 (doi: 10.1161/01.atv.19.1.73)
- Yamamoto E, Lai ZF, Yamashita T, Tanaka T, Kataoka K, Tokutomi Y et al. Enhancement of cardiac oxidative stress by tachycardia and its critical role in cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Hypertens* 2006; 24: 2057-2069 (doi: 10.1097/01.hjh.0000244956.47114.c1)
- Yan W, Guo LR, Zhang Q, Sun WZ, O'Rourke ST, Liu KX et al. Chronic blockade of class I PI3-kinase attenuates Ang II-induced cardiac hypertrophy and autophagic alteration. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19: 772-783
- Yang CC, Chen YT, Wallace CG, Chen KH, Cheng BC, Sung PH et al. Early administration of empagliflozin preserved heart function in cardiorenal syndrome in rat. *Biomed Pharmacother* 2019; 109: 658-670 (doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.095)
- Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol* 1982; 243: H941-947 (doi: 10.1152/ajpheart.1982.243.6.H941)
- Yoon KH, Shin JA, Kwon HS, Lee SH, Min KW, Ahn YB et al. Comparison of the efficacy of glimepiride, metformin, and rosiglitazone monotherapy in korean drug-naive type 2 diabetic patients: the practical evidence of antidiabetic monotherapy study. *Diabetes Metab J* 2011; 35: 26-33 (doi: 10.4093/dmj.2011.35.1.26)
- Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS Journal* 2007; 274: 630-658
- Young CN. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of hypertension. *Exp Physiol* 2017; 102: 869-884 (doi: 10.1113/EP086274)
- Yu E, Malik VS, Hu FB. Cardiovascular Disease Prevention by Diet Modification: JACC Health Promotion Series. *J Am Coll Cardiol* 2018; 72: 914-926 (doi: 10.1016/j.jacc.2018.02.085)
- Yurista SR, Sillje 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: 862-873 (doi: 10.1002/ejhf.1473)
- Zekry D, Frangos E, Graf C, Michel JP, Gold G, Krause KH et al. Diabetes, comorbidities and increased long-term mortality in older patients admitted for geriatric inpatient care. *Diabetes Metab* 2012; 38: 149-155 (doi: 10.1016/j.diabet.2011.10.001)
- Zhang L, Du J, Yano N, Wang H, Zhao YT, Dubielecka PM et al. Sodium Butyrate Protects -Against High Fat Diet-Induced Cardiac Dysfunction and Metabolic Disorders in Type II Diabetic Mice. *J Cell Biochem* 2017; 118: 2395-2408 (doi: 10.1002/jcb.25902)
- Zhang M, Xu Y, Qiu Z, Jiang L. Sulforaphane Attenuates Angiotensin II-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Migration via Suppression of NOX4/ROS/Nrf2 Signaling. *Int J Biol Sci* 2019; 15: 148-157 (doi: 10.7150/ijbs.28874)

Zhang X, Dostal DE, Reiss K, Cheng W, Kajstura J, Li P et al. Identification and activation of autocrine renin-angiotensin system in adult ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1995; 269: H1791-1802 (doi: 10.1152/ajpheart.1995.269.5.H1791)

Zhao D, Liu H, Dong P. Empagliflozin reduces blood pressure and uric acid in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *J Hum Hypertens* 2019; 33: 327-339 (doi: 10.1038/s41371-018-0134-2)

Zhao Y, Xu L, Tian D, Xia P, Zheng H, Wang L et al. Effects of sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors on serum uric acid level: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Obes Metab* 2018; 20: 458-462 (doi: 10.1111/dom.13101)

Zhou Y, Wu W. The Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor, Empagliflozin, Protects against Diabetic Cardiomyopathy by Inhibition of the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. *Cell Physiol Biochem* 2017; 41: 2503-2512 (doi: 10.1159/000475942)

Zhuang P, Cheng L, Wang J, Zhang Y, Jiao J. Saturated Fatty Acid Intake Is Associated with Total Mortality in a Nationwide Cohort Study. *J Nutr* 2019; 149: 68-77 (doi: 10.1093/jn/nxy237)

Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2015; 373: 2117-2128 (doi: 10.1056/NEJMoa1504720)

ANEXO A – Comitê de ética



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do inibidor seletivo do SGLT2, empagliflozina, em modelo experimental de esteatose hepática", registrada com o nº 031/2017, sob a responsabilidade de Sandra Barbosa da Silva - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 25/07/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/07/2021
Espécie/inhagem/raça	Camundongo C57BL/6
Nº de animais	50
Peso/idade	20 g / 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 25 de Julho de 2017.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patrícia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ

ANEXO B – Comprovante de submissão do artigo

Life Sciences

Empagliflozin mitigates left ventricle hypertrophy and modulates local Renin-Angiotensin pathway in high-fat-fed mice

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Full Length article
Keywords:	empagliflozin; renin angiotensin pathway; endoplasmic reticulum; oxidative stress; left ventricle
Corresponding Author:	Sandra Barbosa-da-Silva, Ph.D. Universidade do Estado do Rio Janeiro Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL
First Author:	Juliana Cordovil Cotrin
Order of Authors:	Juliana Cordovil Cotrin
	Gabriel Santos Martins de Souza
	Tamiris Ingrid Petito-da-Silva
	Luiz Eduardo Macedo Cardoso
	Vanessa Souza-Mello
	Sandra Barbosa-da-Silva, Ph.D.
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	Aims The cardio-benefits of empagliflozin are multidimensional and some mechanisms still unclear. The aim of the present study was to evaluate the effect of treatment with empagliflozin on biometric parameters and gene expression in the local cardiac RAS, oxidative stress and endoplasmic reticulum pathways in mice model. Main methods Forty male C57BL/6 mice were fed with a control (C) or high-fat (HF) diets for 10 weeks. After that, the groups were redistributed according to the treatment with empagliflozin, HF, C, CE, HFE. The empagliflozin was administered via food for 5