



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: FISILOGIA E FARMACOLOGIA



Renata Gomes Miranda e Castor

**EFEITOS DA GLIBENCLAMIDA SOBRE A ATIVAÇÃO
CARDÍACA DE INFLAMASSOMA NLRP3 INDUZIDA POR
DIETA RICA EM CARBOIDRATOS REFINADOS**

Belo Horizonte

2019

Renata Gomes Miranda e Castor

**EFEITOS DA GLIBENCLAMIDA SOBRE A ATIVAÇÃO
CARDÍACA DE INFLAMASSOMA NLRP3 INDUZIDA POR
DIETA RICA EM CARBOIDRATOS REFINADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Stêfany Bruno de Assis Cau

Belo Horizonte

2019


**"EFEITOS DA GLIBENCLAMIDA SOBRE A ATIVAÇÃO
CARDÍACA DE INFLAMASSOMA NLRP3 INDUZIDA POR DIETA
RICA EM CARBOIDRATOS REFINADOS"**

RENATA GOMES MIRANDA E CASTOR

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 08 de abril de 2019, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROFA. DR^a. DANIELLA BONAVENTURA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DR^a. DANIELE DA GLÓRIA DE SOUZA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. STEFFANY BRUNO DE ASSIS CAU
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 08 de abril de 2019

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me dado saúde corporal e mental durante essa caminhada. E por ter mandado dois anjinhos para iluminar minha vida, Lucas e Lívia. Minha crença foi o pilar que me sustentou e me manteve no foco do meu trabalho.

À minha família, que incentivou e incentiva os meus estudos o tempo todo. Ao meu marido que aguentou todo o meu estresse e nervosismo, e tomou conta do serviço da casa sozinho todo esse tempo para que eu pudesse estudar. Aos meus pais. À minha mãe que cuidou do meu filho com muito amor e carinho desde os quatro meses de idade, e ao meu pai pelo incentivo aos estudos e pelo suporte financeiro durante todo o tempo, que me possibilitou estudar tranquilamente. Às minhas irmãs, cunhados e sobrinhos, por toda a ajuda e alegria que me deram e dão constantemente.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais pelo privilégio de poder estudar nesta instituição desde 2008, quando comecei minha graduação, em 2014 quando fiz minha pós-graduação, e em 2016 quando fui aceita para fazer meu mestrado.

À minha irmã, a professora Marina Gomes Miranda e Castor Romero, por ter me levado até ao laboratório e me apresentado ao meu futuro orientador, e também ao professor Thiago Roberto Lima Romero por ter me auxiliado nos estudos para que eu conseguisse ingressar no mestrado.

Agradeço à minha amiga e professora Kátia Lúcia Moreira Lemos, que sempre foi meu exemplo de vida profissional devido à sua excelência como professora, treinadora e orientadora, e pela disciplina e ética profissional. Obrigada pelos conselhos e orientações de como ser uma boa profissional e de como me comportar no meio acadêmico.

Ao meu orientador, professor Stêfany Bruno de Assis Cau, principalmente pela paciência e perseverança de que tudo daria certo desde o começo. Obrigada por me orientar tão bem, tenho certeza de que fiz um bom trabalho por ter tido um profissional tão competente me orientando. Obrigada pela compreensão com minha vida pessoal, e por entender que nem sempre conseguimos controlar tudo o que acontece. E me desculpe se não correspondi a todas as suas expectativas como primeira aluna de mestrado.

Agradeço ao professor Anderson José Ferreira, à Gisele Foureaux e à Grazielle Aguiar da Biologia Celular, por me receberem tão bem e me auxiliarem e colaborarem várias vezes com os experimentos de pletismografia e histologia.

Ao professor Thiago Roberto Lima Romero por ter me auxiliado com os animais e reagentes que precisei durante o meu mestrado.

À professora Marina Gomes Miranda e Castor Romero pelos materiais, reagentes e testes moleculares realizados.

Ao professor Robson Santos e ao Marcos Melo pela oportunidade de realização do ecocardiograma no meu trabalho.

À professora Daniela Bonaventura por me permitir acesso irrestrito ao seu laboratório, me disponibilizando reagentes e materiais sempre que precisei, e por me receber com tanto carinho e atenção todas as vezes que precisei.

Agradeço aos professores da USP de Ribeirão Preto. À professora Rita Tostes e sua aluna Camila André Pereira, pela realização dos testes de *western blot* e fluorescência feitos com muita qualidade, e por sempre me atenderem e me auxiliarem com muita atenção e carinho.

Aos professores Rubens Fazan e Fernando Carneiro por me cederem o espaço de seus laboratórios durante vários dias, utilizando de seus materiais de alta qualidade, para o aprendizado da cirurgia de canulação da artéria carótida, que foi tão importante para a realização dos testes funcionais do meu trabalho. Agradeço ao técnico Carlos Alberto Aguiar, pela paciência e competência no ensino da cirurgia, e por me tratar com tanta atenção todos os dias.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, pois sem eles, meu mestrado não aconteceria. Quando cheguei ao laboratório não sabia fazer nada e aprendi tudo com vocês. O cotidiano com todos vocês era tão bom, que esses dois anos de mestrado passaram muito rápido. Fiquei muito emocionada com a capacidade de todos vocês ajudarem uns aos outros sem esperar algo em troca, principalmente por saberem que eu, estando grávida, não poderia muitas vezes ajudá-los em seus experimentos também. Agradeço em especial ao meu amigo Alexandre Santos Bruno por ter participado de todos os meus experimentos, e por várias vezes ter ficado até tarde da noite terminando o experimento sozinho para que eu pudesse ir embora buscar meu filho. Nunca me esquecerei da ajuda que você me deu, e sempre serei grata por isso. Muito obrigada por tudo. Patrícia, Bárbara, Pedro, Marcele, Bela, Ítalo, Lucas, Jaque, Karol, Karla, Dani Reis, Natalia e Nati cotoco, muito obrigada pela amizade valiosa de vocês e por toda ajuda e alegria que me deram.

Agradeço aos alunos de iniciação científica que acompanharam meu trabalho, Sofia, Isabela, Amanda, Larissa e Fábio que me ajudaram muito. Vocês são muito inteligentes, competentes, aprendiam super rápido e faziam tudo direitinho. Todos vocês foram valiosos para mim e muito importante no meu trabalho. Sem vocês tudo teria demorado o dobro do tempo.

Agradeço ao Webster Pimenta que sempre me socorreu varias vezes, na gavagem, no manuseio com os animais, na matemática que não entra na minha cabeça de jeito nenhum e

pelos nossos bate papos tão agradáveis todos os dias de manhã. Sempre te levarei no meu coração.

Aos animais usados nos experimentos, minha gratidão e respeito.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e da Inflamação (LAFACI), do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

RESUMO

O consumo de alimentos com alto teor de açúcares refinados vem aumentando durante os últimos anos. A discussão sobre o açúcar como o principal macronutriente danoso ao aparelho cardiovascular, em lugar do sal e da gordura saturada, ganhou notoriedade. Um estudo prospectivo realizado em 18 países mostrou que um consumo de carboidratos maior que 60% da energia diária está associado a um alto risco de mortalidade e risco cardiovascular. O açúcar é um conhecido ativador da lesão de células pancreáticas por meio da ativação do inflamassoma NLRP3. O inflamassoma NLRP3 é um complexo protéico formado pela junção do receptor NLRP3, uma proteína adaptadora ASC e pró-caspase-1, que culmina na maturação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-18. Porém, ainda não foi demonstrado se este mecanismo também está envolvido na lesão cardíaca induzida pela dieta HC. O objetivo foi elucidar o mecanismo envolvido no desenvolvimento do dano cardíaco induzido por dieta HC por meio da inibição farmacológica do inflamassoma NLRP3 com baixas doses de glibenclamida. Camundongos machos Balb/c foram alimentados com dieta padrão ou HC durante oito semanas. A glibenclamida (20 mg/kg, P.O), uma sulfoniluréia que inibe inflamassoma NLRP3, ou veículo, foram administrados diariamente nas últimas quatro semanas. Os animais tiveram livre acesso à água e comida e foram divididos em quatro grupos: controle-veículo (CV), controle-glibenclamida (CG), HC-veículo (HCV), HC-glibenclamida (HCG). A pressão arterial não-invasiva e o teste de resistência a insulina (TRI) foram medidos antes e depois do tratamento. Todos os animais foram eutanasiados por decapitação sob anestesia (cetamina: xilazina, 80:10 mg/kg, I.P.); o coração e outros órgãos, e tecidos adiposos foram retirados e pesados. A dieta HC causou dano morfofuncional no coração. Houve aumento do peso do coração e da espessura do ventrículo esquerdo e diminuição da câmara ventricular esquerda, indicando hipertrofia cardíaca concêntrica. A dieta HC também causou prejuízo da função de contração e do relaxamento cardíaco, sem mudança da pressão arterial. De importância, houve aumento *in situ* da atividade da caspase-1. Todos os danos causados pela dieta HC foram revertidos pela glibenclamida, sem que a mesma interferisse no TRI. Conclui-se que o consumo de uma dieta rica em carboidratos refinados causa danos ao coração por meio da ativação do inflamassoma NLRP3, com conseqüente aumento de caspase-1. A glibenclamida reverte o remodelamento e a disfunção cardíaca provocados pela dieta HC, se mostrando uma droga promissora para evitar o desenvolvimento de insuficiência cardíaca.

ABSTRACT

The consumption of foods with high refined sugars has been increasing in recent years. The discussion of sugar as the main deleterious macronutrient to the cardiovascular system, rather than salt and saturated fat, gained notoriety. A prospective study in 18 countries showed that carbohydrate consumption greater than 60% of daily energy is associated with a high risk for heart disease and mortality. Sugar is a known activator of pancreatic cell injury by the activation of NLRP3 inflammasome. NLRP3 inflammasome is a protein complex formed by the NLRP3 receptor, an adapter protein named ASC, and caspase-1, which culminates in the maturation of pro-inflammatory cytokines such IL-1 β and IL-18. However, it has not been demonstrated yet whether this mechanism is also involved in the cardiac injury induced by the HC diet. The objective was to elucidate the mechanism involved in the development of cardiac damage induced by the HC diet, by pharmacological inhibition of NLRP3 inflammasome with a low dose of glibenclamide. Male Balb/c mice were fed with chow or HC diet for eight weeks. Glibenclamide (20mg/kg, i.g.), a sulfonylurea that inhibits NLRP3 inflammasome or vehicle were given daily in the final four weeks. The animals had free access to water and food and were divided into four groups: control-vehicle (CV), control-glibenclamide (CG), HC-vehicle (HCV), HC-glibenclamide (HCG). Noninvasive blood pressure measure and insulin resistance test (IRT) were performed before and after the treatment. All animals were euthanized by decapitation under anesthesia (ketamine: xylazine, 80:10 mg/kg, I.P.); the heart and other organs, and adipose tissues were harvested and weighed. The HC diet caused morphofunctional damage to the heart. There was an increase in the heart weight heart and left ventricle thickness and a decrease in the left ventricular chamber area, indicating concentric cardiac hypertrophy. The HC diet also caused an impairment in heart contraction and relaxation, with no change in blood pressure. Importantly, there was an increased in caspase-1 activity *in situ*. All heart changes induced by the HC diet were reversed by glibenclamide without interfering with IRT. We conclude that the consumption of a diet rich in refined carbohydrates causes damage to the heart through the activation of NLRP3 inflammasome and, consecutively, increased caspase-1 activity. Glibenclamide reverses the remodeling and cardiac dysfunction caused by the HC diet, being a promising drug to prevent the development of heart failure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da ativação do inflamassoma NLRP3.	19
Figura 2: Representação esquemática do delineamento experimental do protocolo temporal.	24
Figura 3: Representação esquemática do delineamento experimental protocolo com tratamento farmacológico.	25
Figura 4: Representação esquemática e cálculo morfometria cardíaca.	29
Figura 5: Expressão da proteínas NLRP3 e IL-1 β .	34
Figura 6: Efeitos da glibenclamida (5 mg/kg) sobre parâmetros biométricos	35
Figura 7: Parâmetros de homeostasia da glicose antes do tratamento com glibenclamida (5mg/kg).	36
Figura 8: Parâmetros de homeostasia da glicose após o tratamento com glibenclamida (5mg/kg).	37
Figura 9: Pressão arterial sistólica glibenclamida (5 mg/kg).	38
Figura 10: Efeitos da glibenclamida (5mg/kg) sobre a hipertrofia cardíaca.	38
Figura 11: Efeitos da glibenclamida (20 mg/kg) sobre parâmetros biométricos.	40
Figura 12: Efeitos da glibenclamida (20 mg/kg) na homeostasia da glicose.	41
Figura 13: Pressão arterial sistólica glibenclamida (20 mg/kg).	42
Figura 14: Efeitos da glibenclamida (20 mg/kg) sobre a hipertrofia cardíaca.	43
Figura 15: Morfometria cardíaca.	45
Figura 16: Medida invasiva da pressão arterial.	45
Figura 17: Avaliação invasiva da função cardíaca.	46
Figura 18: Fluorescência da caspase-1 no ventrículo esquerdo.	48
Figura 19: Fluorescência da caspase-1 no septo	49
Figura 20: Infiltrado de macrófagos	50
Figura 21: Modelo proposto da ativação cardíaca do inflamassoma NLRP3 induzida por dieta rica em açúcar	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos da dieta HC sobre parâmetros estruturais e funcionais no ecocardiograma 33

Tabela 2: Efeitos da glibenclamida (5mg/kg) sobre o peso dos órgãos39

Tabela 3: Efeitos da glibenclamida (20 mg/kg) sobre o peso dos órgãos44

LISTA DE ABREVIATURAS

ACVE	Área da câmara ventricular esquerda
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein</i>
ASC	Área sob a curva
AST	Área secção transversa
CARD	Domínio de recrutamento e ativação de caspase
CMC	Carboximetilcelulose
CG	Controle + glibenclamida
CV	Controle + veículo
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
EP	Espessura da parede
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GSDMD	Gasdermina D
HC	<i>High carbohydrate</i>
HCG	Dieta rica em carboidratos + glibenclamida
HCV	Dieta rica em carboidratos + veículo
IC	Insuficiência cardíaca
LPS	Lipopolissacarídeo
NLR	Receptores do tipo NOD
NLRP	<i>NOD-like receptor oligomerization domain</i>
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAMP	Padrões moleculares associados ao patógeno
PAS	Pressão arterial sistólica
RLHs	Helicases do tipo RIG
RRP	Receptor de reconhecimento padrão
TLR	Receptores do tipo Toll
TRI	Teste de resistência a insulina
TTOG	Teste tolerância oral à glicose
V	Veículo
VE	Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	14
2- OBJETIVOS	22
2.1 Geral	22
2.2 Específicos	22
3- MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Animais experimentais	23
3.2 Delineamento experimental	23
3.3 Ecocardiografia torácica	25
3.4 Extração de proteínas e <i>Western Blot</i>	26
3.5 Avaliação do peso corporal dos animais e do consumo de ração	26
3.6 Teste de resistência à insulina	27
3.7 Teste de tolerância oral à glicose	27
3.8 Registro não invasivo da pressão arterial	27
3.9 Eutanásia e coleta de órgãos	28
3.10 Análise histológica	28
3.10.1 Análise morfométrica cardíaca	28
3.11 Função ventricular esquerda <i>in vivo</i>	29
3.12 Detecção de caspase-1 ativa	30
3.13 Quantificação do infiltrado de macrófagos	30
3.14 Análises estatísticas	31
4- RESULTADOS	32
4.1 Caracterização das alterações cardíacas induzidas por dieta HC	32
4.1.1 Alterações morfofuncionais cardíacas	32
4.1.2 Ativação do inflamassoma NLRP3	34
4.2 Efeitos da glibenclamida (5 mg/kg) sobre parâmetros biométricos e de homeostasia da glicose	35
4.3 Efeitos da glibenclamida (5mg/kg) sobre parâmetros cardiovasculares.....	37
4.4 Efeito da glibenclamida (20mg/kg) sobre parâmetros biométricos e de homeostasia da glicose	39
4.5 Efeitos da glibenclamida (20 mg/kg) sobre parâmetros cardiovasculares.....	42

4.6 A dieta HC aumentou a atividade da caspase-1 <i>in situ</i> e a glibenclamida reduziu essa ativação.....	47
5- DISCUSSÃO	51
6- CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS	59

1- INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o consumo mundial de açúcar está muito acima do recomendado. A quantidade de açúcar diário nunca deve exceder 25 gramas ou não ultrapassar 5% das calorias ingeridas diariamente (WHO 2015). Nos Estados Unidos, o consumo é de 126,4 gramas de açúcar por pessoa diariamente. Outros países como Canadá, Austrália, Alemanha, Bélgica e Reino Unido compõem a lista dos países que mais consomem açúcar no mundo, tendo seu consumo entre 100 a 90 gramas diários (Worldatlas 2017). Esse alto consumo de açúcar vem principalmente de bebidas açucaradas (Dhingra, Sullivan et al. 2007, Vartanian, Schwartz et al. 2007), xaropes, alimentos processados e ultraprocessados, prontos para consumo (DiNicolantonio and Lucan 2014).

Um estudo realizado pela Universidade da Carolina do Norte em parceria com a Universidade do Estado do Rio de Janeiro mostrou que 13% da energia diária consumida (1921 kcal/dia) em uma região do Brasil vêm do açúcar, principalmente de bebidas açucaradas e doces (Pereira, Duffey et al. 2012). Outro estudo feito no Brasil com 5.000 famílias atendidas pelo Programa Bolsa Família mostrou que, com o aumento do poder aquisitivo das famílias, a procura por alimentos não saudáveis é maior, principalmente refrigerantes e açúcar (de Bem Lignani, Sichieri et al. 2010). O Guia Alimentar Para a População Brasileira publicado pelo Ministério da Saúde em 2014 mostra que, em países emergentes como o Brasil, está ocorrendo uma mudança no padrão alimentar, envolvendo a substituição de produtos *in natura* (arroz, feijão, legumes e verduras) ou minimamente processados, por produtos industrializados prontos para consumo.

Segundo o guia, alimentos *in natura* são aqueles obtidos diretamente de plantas ou de animais, como frutas, verduras, ovos e leite, ou qualquer outro alimento que não tenha sofrido qualquer alteração após deixarem a natureza. Alimentos minimamente processados são aqueles *in natura* que sofreram pequenas alterações para o consumo, como grãos moídos e empacotados, cortes de carnes congelados ou leite pasteurizado. Já alimentos processados, são aqueles fabricados com adição de sal, açúcar, óleo, vinagre ou outra substância de uso culinário com extrato de tomates, frutas em calda ou cristalizadas, atum enlatado, queijo, pães entre outros. Por fim, alimentos ultraprocessados são aqueles que envolvem diversas etapas e técnicas de processamento, feitas em geral por indústrias, e com adição de muitos ingredientes, como sal, açúcar, óleos e gorduras, proteínas de soja e do leite, extratos de carnes, substâncias sintetizadas em laboratório a partir de alimentos e derivados de petróleo e carvão, atuando como aditivos alimentares para darem cor, aroma, sabor e textura de forma que torne os alimentos extremamente atraentes. Fazem parte desta classe pós para refresco,

refrigerantes, balas, sorvetes, salgadinhos de pacote, macarrão e temperos instantâneos, salsichas e outros embutidos, entre outros. Cerca de 30,5% dos alimentos consumidos na dieta brasileira são processados ou ultraprocessados, isto é, apresentam maior densidade energética, maior teor de gorduras em geral, de gordura saturada, de gordura trans e de açúcar livre (Costa Louzada et al., 2015). Açúcares livres ou de adição incluem monossacarídeos e dissacarídeos adicionados pelo fabricante, cozinheiro ou consumidor à alimentos e bebidas e açúcares naturalmente presentes em mel, xaropes, sucos de fruta ou concentrados de suco de fruta (WHO 2015).

O crescente consumo de alimentos ultraprocessados com alto teor de gordura e açúcar é a principal causa do aumento de número de indivíduos obesos e diabéticos no mundo (Costa Louzada, Martins et al. 2015). Obesidade e diabetes são condições altamente relacionadas com a incidência e morte por doenças cardiovasculares (Huynh, Bernardo et al. 2014). Jovens entre 12 e 18 anos acompanhados por cinco anos por questionários aumentaram seu consumo de açúcar de 62g para 119g, principalmente através de bebidas açucaradas. Esse aumento no consumo veio acompanhado de aumento na dislipidemia, aumento no peso corporal, resistência à insulina, sobrepeso e obesidade em alguns, aumentando assim o risco de doenças cardiovasculares (Welsh, Sharma et al. 2011). Essas doenças se tornaram um problema até mesmo econômico, uma vez que só medidas de tratamento e prevenção ao diabetes geram um gasto anual de mais de 827 bilhões de dólares no mundo (WHO 2016).

Um estudo de regressão linear com 1.648 crianças entre quatro e 18 anos mostrou que o consumo de bebidas açucaradas estava associado a um maior índice de massa corporal, maior nível de glicose e triglicérides e maior raio cintura quadril, sendo todos estes, fatores de risco cardiometabólicos (Seferidi, Millett et al. 2018). Outro estudo que acompanhou 6.039 pessoas por quatro anos mostrou que o risco cardiometabólico aumenta com o consumo de uma ou mais bebidas açucaradas por dia (Dhingra, Sullivan et al. 2007). Yang, Z. et al. 2014, baseado em dados de consumo de 1988 a 2010, mostraram que um maior consumo de açúcar aumentou a mortalidade por doença cardiovascular, sendo novamente o consumo de bebidas açucaradas o maior contribuidor no aumento da quantidade de açúcar ingerido. Aproximadamente 10% dos adultos abaixo de 60 anos obtêm 25% ou mais de suas calorias diárias vindas de açúcares de adição, sendo que os indivíduos que consomem entre 17% a 21% de calorias vindas do açúcar, aumentam 38% o risco de mortalidade por doenças cardiovasculares (Yang, Zhang et al. 2014).

De modo mais alarmante, o consumo de açúcares tem se mostrado um fator de risco independente para doenças cardiovasculares. Existem estudos populacionais correlacionando o consumo de açúcares a danos cardiovasculares, embora o efeito sobre o aumento da

mortalidade por evento cardiovascular ainda seja controverso. Um estudo realizado nos Estados Unidos, que acompanhou a dieta de 88.520 mulheres por dez anos, demonstrou que o consumo de bebidas açucaradas aumentou o risco para o desenvolvimento de doença coronariana (Fung, Malik et al. 2009). Por fim, um estudo prospectivo realizado em 18 países de cinco continentes, que acompanhou 135.335 indivíduos por 10 anos por meio de questionários de consumo alimentício, mostrou que um consumo de carboidratos maior que 60% da energia diária está associado a um alto risco de mortalidade e risco cardiovascular (Dehghan et al., 2017). Foram documentadas 5.796 mortes e 4.784 eventos cardiovasculares durante o estudo.

Nos últimos anos, a discussão sobre o açúcar como o principal macronutriente danoso ao aparelho cardiovascular, em lugar do sal (DiNicolantonio and Lucan 2014) e da gordura insaturada (Temple 2018), ganhou notoriedade. Por exemplo, um estudo mostrou que substituição isocalórica de gorduras saturadas por carboidratos refinados aumenta o risco de doença arterial coronariana. O contrário não é verdade. Isto é, a substituição isocalórica de açúcares refinados por gordura saturada não aumentou o risco de doença arterial coronariana (Li, Hruby et al. 2015).

Assim, há um interesse em se pesquisar os efeitos deletérios dos macronutrientes de forma isolada. Vários tipos de dietas foram criadas em laboratório com esta finalidade, como dietas ricas em frutose, ricas em glicose, ricas em gordura, ricas em gordura e carboidrato, ricas em sacarose, entre outras (Huynh, Bernardo et al. 2014).

Uma dieta com excesso de açúcares pode causar danos na função cardíaca, mudança na morfologia cardíaca, no metabolismo cardíaco e até na biofísica das células cardíacas. Ratos alimentados por onze dias com dieta rica em carboidratos, contendo 29% de amido e 29% de sacarose sem fibras, apresentaram danos na contratilidade miocárdica pela diminuição da força de contração ventricular na sístole causados pela queda no uso de glicose e ácidos graxos no metabolismo cardíaco (Porto, Savergnini et al. 2011). Outra dieta rica em sacarose (68% da energia total) causou disfunção nos cardiomiócitos de ratos (Dutta, Podolin et al. 2001). Ratos que tiveram 10% de frutose adicionada à água apresentaram acumulação lipídica intramiocárdica e hipertrofia cardíaca com 24 e 36 semanas de dieta, respectivamente. Além disso, apresentaram maior disfunção cardíaca quando submetidos à isquemia e reperfusão com 56 semanas de dieta em relação aos que receberam dieta controle (Axelsen, Lademann et al. 2010). Camundongos foram alimentados por 12 semanas com dieta rica em frutose (60%) e apresentaram elevação na produção de superóxido no coração, repressão na sinalização de sobrevivência celular e aumento na fibrose, todos estes associados ao aumento de autofagia cardíaca (Mellor, Bell et al. 2011).

Nos alimentos industrializados há uma grande quantidade de açúcar refinado (Costa Louzada, Martins et al. 2015), que é um açúcar que passa por processos químicos, perdendo fibras e vitaminas. Este padrão dietético pode ser mimetizado pela dieta rica em açúcar refinado (ou dieta HC, de *high carbohydrate*). Uma dieta HC desenvolvida por um grupo de pesquisa na UFMG, composta por 30% de sacarose e isocalórica em relação à ração padrão para roedores, mostrou um aumento de adiposidade visceral, intolerância à glicose, aumento da expressão de proteínas pró-inflamatórias, aumento de macrófagos, neutrófilos e linfócitos no tecido adiposo com apenas três dias de dieta HC (Oliveira, Menezes-Garcia et al. 2013). Essa dieta foi utilizada nesse estudo, pois ainda não foi descrito na literatura seu impacto sobre o coração.

Como mencionado, o açúcar pode desencadear inúmeras respostas inflamatórias, que contribuem para as alterações metabólicas (Hotamisligil 2006). Mais do que uma resposta inflamatória, a hiperglicemia ativa mecanismos da imunidade inata, levando ao dano tecidual (Shi, Zhang et al. 2015, Sharma, Tate et al. 2018)

Participam da resposta de imunidade inata os receptores de reconhecimento de padrão (RRP), os quais reconhecem padrões moleculares comuns a organismos estranhos, como vírus, bactérias, fungos ou parasitas (Jo, Kim et al. 2016). Esses padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) podem ser ácidos nucleicos virais, componentes da parede celular de fungos e bactérias, proteínas flagelares, entre outros. Entretanto esse sistema de detecção pode ser ativado por várias proteínas do hospedeiro ou outros sinalizadores. Esses sinalizadores são liberados por células que estão morrendo, conhecidos como padrões moleculares associados a danos (DAMPs), e essa ativação tem um papel importante na origem de várias doenças autoimunes e inflamatórias (Jo, Kim et al. 2016).

A primeira família desses RRP estudada em detalhes foi a dos receptores do tipo Toll (TLR: *toll like-receptors*). Esses receptores possuem um domínio extracelular, para o reconhecimento de DAMPs e PAMPs, e um domínio intracelular que faz a transdução do sinal por meio de proteínas adaptadoras no citoplasma, resultando em recrutamento e ativação de proteínas sinalizadoras. Estas proteínas originam uma resposta de defesa do hospedeiro com produção de peptídeos antimicrobianos, quimiocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, entre outras (Meylan, Tschopp et al. 2006). Em seguida, duas outras famílias de receptores RRP foram descobertas, os receptores do tipo NOD (NLRs: *NOD-like receptors*) e helicases do tipo RIG (RLHs: *RIG-like helicases*), que são receptores intracelulares e reconhecem invasores no citoplasma (Meylan, Tschopp et al. 2006).

Os NLRs compreendem dois sub-grupos, NOD (NOD1-5) e 14 membros do tipo NLRP (*NOD-like receptor oligomerization domain*), que são sintetizados na sua forma inativa (Shen,

Yang et al. 2018). Esses receptores possuem três domínios distintos: um domínio efetor de sinalização que pode ser CARD (*caspase activation and recruitment domain*), PYD (*pyrin domain*) ou BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat*), um domínio rico em repetições de leucina (LRR *leucine-rich repeat*) e um domínio NATCH (*central nucleotide-binding domain/ NOD*) (Magalhaes, Sorbara et al. 2011). Os NLRs possuem cinco subfamílias: NLRP (NLRP1-14), NLRX (NLRX1), NLRC (NOD1, NOD2, NLRC3, NLRC4 e NLRC5), NLRA (CIITA), e NLRB (NAIP: *neuronal apoptosis inhibitory protein*) (Magalhaes, Sorbara et al. 2011), sendo que alguns desses receptores formam inflamassomas.

Inflamassomas são complexos protéicos formados pela junção de receptores do tipo NLR, proteínas adaptadoras ASC (*apoptosis-associated speck-like protein*) e pró-caspases (Shen, Yang et al. 2018), conforme representando na figura 1. Essa junção de proteínas culmina na maturação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-18 por ação proteolítica da caspase-1, que se torna ativa (Yang, Wang et al. 2019). Para isso são necessários dois sinais (figura 1): um “sinal 1” decorre da ativação de um RRP, como o TLR por DAMPS ou PAMPs, induzindo a expressão gênica da forma inativa dos receptores que formam inflamassomas e das pró-formas das citocinas IL-1 β e IL-18 (Sharma, Tate et al. 2018). Subsequentemente, um “sinal 2”, como toxinas bacterianas, ou metabólitos, como ATP, são detectados pelo inflamassoma, iniciando a formação do complexo protéico. Esse complexo protéico, recruta uma proteína adaptadora de ASC contendo um domínio de recrutamento e ativação de caspase (CARD), e a forma inativa da caspase, pró-caspase, se liga nesse domínio CARD e é ativada. Em seguida, essa caspase, como por exemplo a caspase-1, cliva os precursores inativos das proteínas IL-1 β e IL-18 os tornando ativos, e essas proteínas são liberadas no meio extracelular por macrófagos (figura 1).

Em paralelo, a caspase-1 também cliva a Gasdermina D (GSDMD), que por sua vez induz à formação de poros na membrana, levando à morte celular pró-inflamatória, conhecida como piroptose (Sharma, Tate et al. 2018) (figura 1).

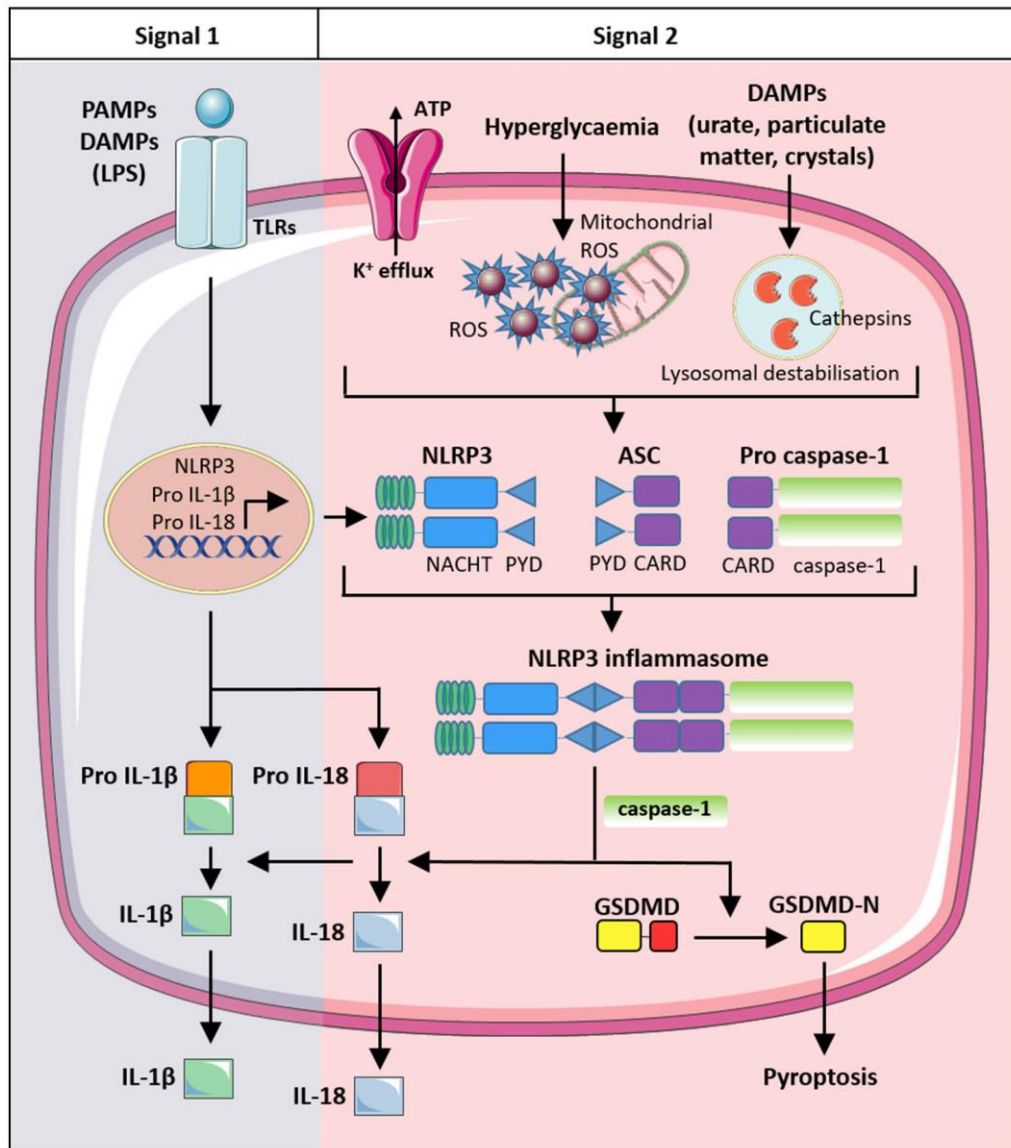


Figura 1: Representação esquemática da ativação do inflamassoma NLRP3. A ativação de inflamassoma NLRP3 ocorre em dois passos. É necessário um sinal 1, de preparação, e um sinal 2, de ativação. O sinal de preparação é comumente iniciado por PAMPs como LPS, que ativam os receptores do tipo toll (TLR), induzindo a expressão de NLRP3, pró-IL-1 β e pró-IL-18. O segundo sinal, de ativação, é a formação do complexo proteico, constituído pelo receptor NLRP3, proteína adaptadora ASC e pró-caspase-1. Efluxo de potássio, produtos da degradação lisossomal e espécies reativas de oxigênio (ROS: *reactive oxygen species*) fazem o segundo sinal de ativação do inflamassoma NLRP3. Após a ativação do inflamassoma NLRP3, a pró-caspase-1 é clivada em caspase-1 e esta, por sua vez, faz a maturação das citocinas IL-1 β e IL-18, que induzem resposta inflamatória, e gasdermina D (GSDMD), que induz formação de poro na membrana, levando à morte celular por piroptoses. Maiores detalhes no texto (Sharma, Tate et al. 2018).

Vários são os PAMPs e DAMPs que podem ativar inflamassomas (Jo, Kim et al. 2016). Lipopolissacarídeo (LPS), lipoproteína bacteriana, peptidoglicano, ácido lipoteiônico, entre outros, que ativam TLRs específicos (Tschopp, Martinon et al. 2003). Cristais de sílica e sais de alumínio ativam inflamassoma NLRP3 (Jo, Kim et al. 2016), cristais de colesterol também

ativam inflamassoma NLRP3 tanto *in vitro* como *in vivo*, estando esta ativação relacionada à patogênese da aterosclerose (Duewell, Kono et al. 2010). Cristais de ácido úrico ativam inflamassoma NLRP3, que por sua vez está ligado ao processo inflamatório da artrite gotosa (Martinon, Petrilli et al. 2006).

O inflamassoma NLRP3 também está envolvido em doenças autoimunes como a síndrome de Muckle-Well, síndrome familiar induzida pelo frio (FCAS – *familial cold autoinflammatory syndrome*) e doença inflamatória multissistêmica de início neonatal. Essas síndromes estão associadas a uma liberação constitutiva de IL-1 β de monócitos devido à ativação espontânea de NLRP3 (Meylan, Tschopp et al. 2006).

O NLRP3 (*NOD-like receptor family pyrin-domain-containing-3*) é caracterizado pela presença de um domínio N-terminal capaz de interagir com a criopirina, e por isso esse receptor interage com a proteína adaptadora contendo criopirina, a ASC (Yang, Wang et al. 2019). Vários são os mecanismos conhecidos através dos quais PAMP's ou DAMP's ativam o inflamassoma NLRP3. Baixas concentrações intracelulares de potássio (K⁺) constituem estímulo comum à ativação do inflamassoma NLRP3. A concentração de potássio diminui por exemplo quando altas concentrações de ATP ativam um receptor purinérgico P2X₇ e promovem um efluxo de K⁺ (Yang, Wang et al. 2019). Espécies reativas de oxigênio (ERO) também ativam o NLRP3 diretamente ou indiretamente em condições de estresse oxidativo (Martinon 2010).

Embora se trate de um mecanismo relacionado à imunidade, alguns trabalhos mostraram a presença dos constituintes do inflamassoma em células do coração, como cardiomiócitos e fibroblastos (Kawaguchi, Takahashi et al. 2011, Mezzaroma, Toldo et al. 2011, Cai, Lu et al. 2014). Importaneamente, a ativação do inflamassoma NLRP3 está implicada na lesão cardíaca associada à isquemia do miocárdio. Quando ocorre dano devido a isquemia/reperfusão, o inflamassoma NLRP3 é ativado nos fibroblastos cardíacos, que induz a produção de interleucina-1 β resultando em resposta inflamatória no coração (Kawaguchi, Takahashi et al. 2011). Em modelo experimental de infarto agudo do miocárdio em ratos foi verificado a presença de inflamassoma NLRP3 no citoplasma de cardiomiócitos próximos da área infartada (Mezzaroma, Toldo et al. 2011). O inflamassoma NLRP3 também está envolvido na inflamação e disfunção cardíaca induzida por glicosídeos cardíacos. Experimentos *in vitro* mostraram que a ouabaína induz à ativação do inflamassoma NLRP3 bem como a subsequente ativação de IL-1 β , sendo esta ativação mediada por efluxo de K⁺ (Kobayashi, Usui-Kawanishi et al. 2017).

Além disso, a inibição do inflamassoma NLRP3 reverte o dano causado pelo infarto. A inibição do receptor purinérgico P2X₇ e da criopirina (NLRP3), usando silenciamento de

RNA ou inibição farmacológica, impede a formação de inflamassoma NLRP3 e limita o tamanho do infarto (Mezzaroma, Toldo et al. 2011). O silenciamento do gene NLRP3 melhorou a inflamação e a disfunção cardíaca e diminuiu a piroptose e a fibrose associadas à cardiomiopatia diabética (Luo, Li et al. 2014), que é uma doença caracterizada por disfunção diastólica, hipertrofia de cardiomiócitos, fibrose e apoptose de cardiomiócitos (Huynh, Bernardo et al. 2014). Portanto, inibidores de inflamassoma NLRP3 podem melhorar os danos cardíacos também em condições estéreis, isto é, nas quais não há um microrganismo causador da lesão (Lamkanfi, Mueller et al. 2009).

Embora novas drogas tenham sido desenvolvidas, Lamkanfi, Mueller et al. 2009 mostraram que um antidiabético utilizado no tratamento do diabetes tipo 2, a glibenclamida, inibe o inflamassoma NLRP3 (Lamkanfi, Mueller et al. 2009). A glibenclamida é a sulfoniluréia mais usada no tratamento do diabetes tipo 2 nos Estados Unidos (Riddle 2003). Essa droga age inibindo canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) nas células β pancreáticas, despolarizando-as e fazendo com que ocorra um influxo de Ca^{2+} , aumentando a concentração intracelular de Ca^{2+} , e assim, a exocitose dos grânulos de insulina (Ashcroft 2005). A glibenclamida inibe o NLRP3 de um modo independente do bloqueio dos canais de K^+ , prevenindo a secreção de IL-1 β e IL-18 induzida por PAMPs, DAMPs e cristais em macrófagos (Lamkanfi, Mueller et al. 2009). A glibenclamida também bloqueia a morte celular dependente de caspase-1 que ocorre quando macrófagos são desafiados *in vitro* com LPS e ATP por um mecanismo dependente da inibição de NLRP3. (Lamkanfi, Mueller et al. 2009).

Camundongos que receberam injeção de LPS para indução da sepse e estreptozotocina para indução do diabetes tiveram o dano miocárdio e a infiltração de macrófagos diminuídos pelo pré-tratamento com baixas doses de glibenclamida, que suprimiu o aumento dos níveis de IL-1 β , sem alterar o perfil metabólico dos animais (Cai, Lu et al. 2014).

Embora se reconheça o papel do inflamassoma NLRP3 na lesão cardíaca, sua implicação nas alterações cardíacas causadas pela dieta rica em carboidratos refinados ainda não é conhecida.

A hipótese deste trabalho é que a glibenclamida reverte os danos cardíacos induzidos pela dieta rica em carboidratos refinados por um mecanismo envolvendo a inibição local do inflamassoma NLRP3.

2- OBJETIVOS

2.1 Geral

Verificar os efeitos da glibenclamida sobre a ativação cardíaca de inflamassoma NLRP3 induzida por dieta rica em carboidratos refinados.

2.2 Específicos

Verificar se a dieta rica em carboidratos refinados ativa o inflamassoma NLRP3 no miocárdio, levando ao remodelamento e à disfunção cardíaca.

Verificar se a inibição farmacológica do inflamassoma NLRP3 com glibenclamida reverte as alterações cardíacas induzidas pela dieta rica em carboidratos refinados.

Verificar se a glibenclamida exerce seus efeitos por meio de alterações de fatores que influenciam a função cardíaca, como pressão arterial, adiposidade e resistência à insulina.

Avaliar o efeito da glibenclamida sobre a inibição cardíaca de inflamassoma NLRP3.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/c com seis semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia com temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) controladas, com livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o número de protocolo 389/2016.

3.2 Delineamento experimental

O estudo foi dividido em três protocolos. O primeiro foi conduzido para avaliar se a dieta HC leva à disfunção cardíaca e à ativação do inflamassoma NLRP3. Os animais foram divididos em três grupos num protocolo temporal: controle (alimentados com a dieta padrão para roedores Nuvital, Colombo, PR), quatro semanas de dieta (4s) e oito semanas de dieta (8s) (figura 2) alimentados com uma dieta rica em carboidratos refinados, que será referida nesse trabalho como HC, do termo em inglês *high carbohydrate*. Essa dieta é composta de 45% de ração padrão para roedores moída, 45% de leite condensado Nestlé e 10% de açúcar refinado União (Oliveira, Menezes-Garcia et al. 2013). Essa dieta é isocalórica em relação à padrão e contém 30 % de sacarose, que não está presente na dieta padrão. A função cardíaca foi avaliada por ecocardiografia e a expressão de alguns dos componentes do inflamassoma NLRP3 por *western blot*, conforme descrito adiante.

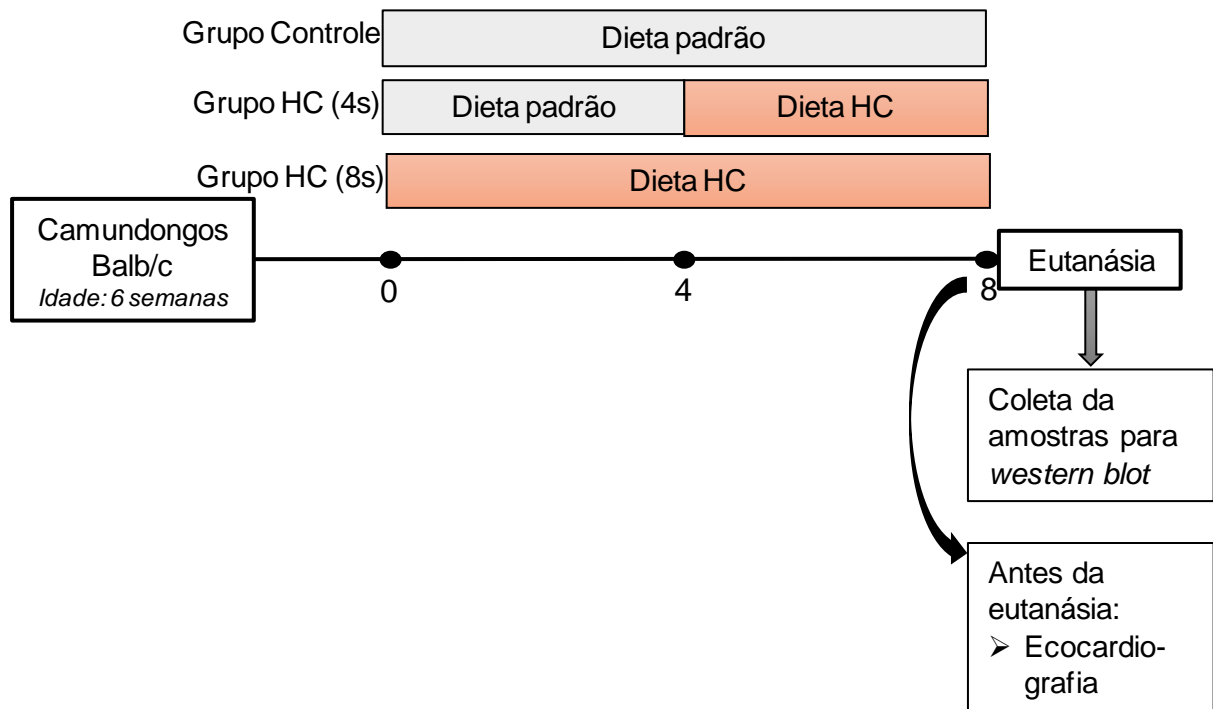


Figura 2: Representação esquemática do delineamento experimental do protocolo temporal.

A fim de avaliar o envolvimento direto do inflamassoma NLRP3 nas alterações cardíacas induzidas pela dieta HC, foram executados o segundo e o terceiro protocolo, no qual os animais foram tratados com glibenclamida, uma sulfoniluréia que inibe inflamassoma NLRP3 (Lamkanfi, Mueller et al. 2009), nas doses de 5mg/kg e 20mg/kg respectivamente. Assim, os animais foram divididos inicialmente em dois grupos: C (controle) e HC (dieta), onde o grupo HC consumiu a dieta rica em carboidrato por 4 semanas e logo após foram realizados testes metabólicos de resistência à insulina e tolerância oral à glicose. Após esses testes metabólicos, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Controle+Veículo (CV), Controle+Glibenclamida (CG), Dieta+Veículo (HCV), Dieta+Glibenclamida (HCG). Os animais dos grupos controle CV e CG foram alimentados com dieta padrão para roedores (Nuvital, Colombo, PR). Os animais dos grupos dieta foram alimentados com a dieta HC por mais quatro semanas, e os animais dos grupos CG e HCG receberam a droga glibenclamida durante as quatro semanas finais do experimento, nas doses de 5mg/kg ou 20mg/kg (Cai, Lu et al. 2014), diariamente por gavagem. A glibenclamida foi administrada em suspensão em veículo constituído de salina 0,9% e carboximetilcelulose (CMC) 0,5%. A glibenclamida é insolúvel em veículo aquoso e a CMC foi usada como agente suspensor. As doses de glibenclamida seguiram trabalho prévio, que mostrou inibição do inflamassoma NLRP3 no coração, sem alterações da glicemia (Cai, Lu et al. 2014). Após as quatro semanas de tratamento os animais foram eutanasiados (figura 3).

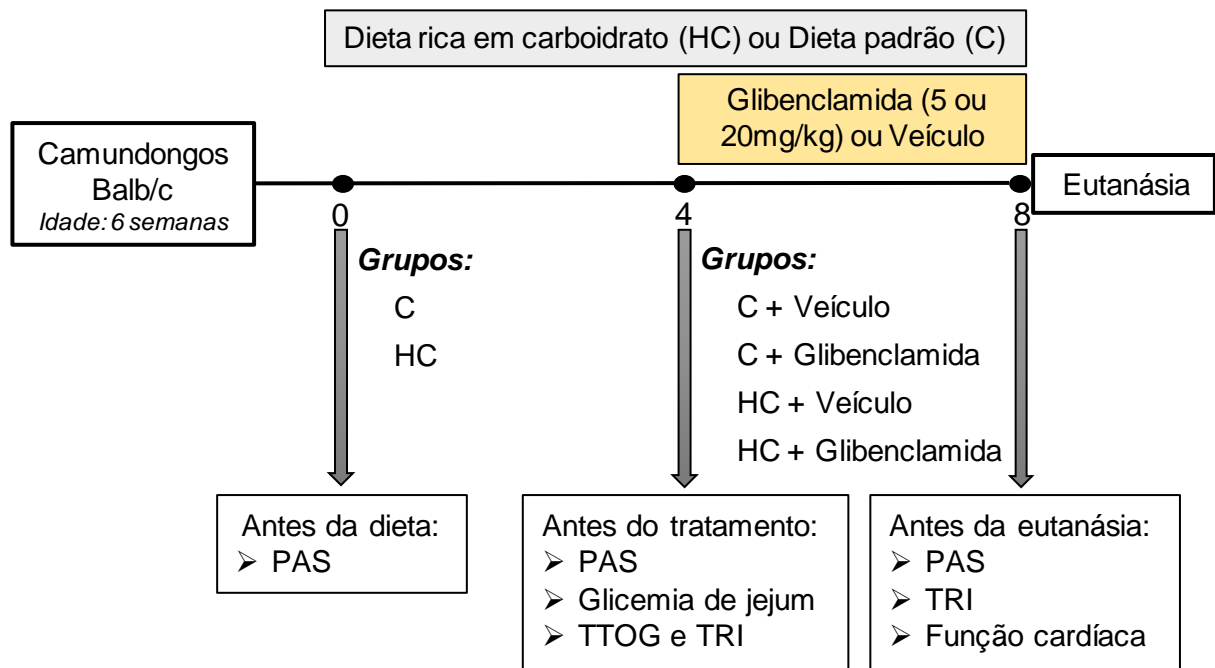


Figura 3: Representação esquemática do delineamento experimental protocolo com tratamento farmacológico. PAS: pressão arterial sistólica; TTOG: teste de tolerância oral a glicose; TRI: teste de resistência à insulina.

3.3 Ecocardiografia torácica

Os animais foram submetidos a exame ecocardiográfico transtorácico sob anestesia inalatória com isoflurano, a 5% para indução e 1,5% para manutenção (Gao, Ho et al. 2011). A função e a morfologia cardíaca *in vivo* foram avaliadas por método não invasivo, de alta frequência por meio do sistema de ecocardiografia de alta resolução, que consiste de uma máquina de ultra-som Vevo 2100 equipado com 16-40 MH-z (Visual Sonics, Toronto, Canadá). Após indução anestésica, os camundongos foram colocados em posição supina em uma mesa equipada, e em seguida foram submetidos a tricotomia de tórax e abdômen. A mesa é equipada com eletrodos para monitorização com eletrocardiograma e sistema de aquecimento para manutenção da temperatura corporal em 37°C. As imagens registradas e os cálculos foram realizados de acordo com a Sociedade Americana de Ecocardiografia (Pellikka, Nagueh et al. 2007). As seguintes medidas foram realizadas em Modo-M: espessura septal na diástole e sístole, espessura do ventrículo esquerdo na diástole e sístole, débito cardíaco, diâmetro da câmara do ventrículo esquerdo na diástole e sístole, fração de ejeção, fração de encurtamento, massa do ventrículo esquerdo, volume de ejeção, volume na diástole, volume na sístole e frequência cardíaca.

3.4 Extração de proteínas e *Western Blot*

Os ápices dos corações retirados de cada animal foram congelados em nitrogênio líquido, pulverizados e homogeneizados com tampão de lise gelado [50 mM Tris HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 1% Deoxicolato, Triton-X-100 1%, 10 mM ortovanadato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio e *cocktail* de inibidores de protease (Sigma)] para extração de proteína total. O extrato foi colocado em tubos Eppendorf em um homogeneizador de tubos a 4°C por 2 horas. Os extratos teciduais foram centrifugados por 20 minutos a 13.000 RPM a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e o conteúdo proteico total foi quantificado utilizando o método de Bradford (BioRad) (Bradford 1976).

As proteínas (30 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (*sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* – SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose. Para comprovar a eficiência da transferência, as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau 2%. Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados com TBS-T + 5% de albumina de soro bovino (BSA, *Bovine Serum Albumins*). As membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos: Human/Mouse NLRP3/NALP3 Antibody - MAB7578 - R&D Systems - (1:500); anti-mouse interleukin-1b (IL-1B) - Sigma-Aldrich - I3767-1MG - (1:500); Anti-GAPDH - Sigma-Aldrich - G9545- (1:20.000); Anti-rabbit IGG (Whole Molecule) - Sigma-Aldrich - A0545 (1:15.000); Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) - Abcam Ab6789 (1:5.000); Anti-rat IGG (Whole Molecule) - Sigma-Aldrich R3756 (1:1.000); Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) - Abcam ab6721 (1:2.000). As bandas foram visualizadas após reação com o reagente Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore®, Burlington, Massachusetts, EUA) e a captura da imagem realizada em fotodocumentador Image Quant 350 (GE Healthcare, Piscata Way, NJ, EUA). As imagens foram quantificadas pelo programa Image J.

3.5 Avaliação do peso corporal dos animais e do consumo de ração

O peso dos animais e o consumo das rações controle e HC foram monitorados semanalmente para verificar se o consumo da dieta HC alteraria o peso dos animais e se o consumo da ração seria diferente entre os grupos. O consumo de ração foi medido duas vezes por semana durante as oito semanas de experimento. Cada caixa recebia 200g de ração, tanto a controle como a HC, e a ração remanescente na caixa era pesada e completada novamente para 200g. A diferença de peso entre ração colocada e ração restante era computada como consumo por semana por caixa. Assim, ao final das oito semanas, todo o consumo de ração

medido semanalmente foi somado de forma crescente. Esse valor total foi dividido pelo número de animais da caixa, obtendo-se assim o consumo médio por animal.

3.6 Teste de resistência à insulina

O teste de resistência à insulina (TRI) foi realizado com quatro e oito semanas de dieta, sempre pela manhã, sem jejum noturno. Foi coletada uma gota de sangue após pequena secção da cauda para mensurar glicemia basal. Em seguida, os animais receberam injeção intraperitoneal de solução de insulina regular diluída em salina (0,75 U/Kg). A partir da administração de insulina foram realizadas coletas seriadas de amostras de sangue da cauda nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos (Oliveira, Menezes-Garcia et al. 2013). A glicemia foi mensurada por fitas reativas Roche® e aparato de leitura das fitas Accu-chek Active Roche®.

3.7 Teste de tolerância oral à glicose

O teste de tolerância oral à glicose (TTOG) foi realizado com quatro semanas de dieta, pela manhã, após jejum noturno de 12 horas. Foi coletada uma gota de sangue após pequena secção da cauda para mensurar glicemia em jejum. Em seguida receberam solução de glicose (25% p/v) por gavagem (2 g/Kg). A partir da administração de glicose foram realizadas coletas seriadas de amostras de sangue da cauda nos tempos 15, 30, 60 e 90 minutos (Oliveira, Menezes-Garcia et al. 2013). A glicemia foi mensurada por fitas reativas Roche® e aparato de leitura das fitas Accu-chek Active Roche®.

3.8 Registro não invasivo da pressão arterial

A pressão arterial sistólica (PAS) dos animais acordados (não anestesiados) foi registrada indiretamente por pletismografia de cauda (CODA®, Kent Scinetific) no início da dieta, depois de quatro semanas (antes do tratamento) e ao final das oito semanas (antes de serem eutanasiados). Para tanto, os animais foram contidos em contensores de acrílico com tamanho adequado à faixa de peso corporal e com perfurações que permitiram a troca de ar. Foi acoplado um manqueto e um transdutor à cauda, que mede as alterações pressóricas que são transferidas para o programa. Os animais foram habituados por dois dias consecutivos e no terceiro dia registraram-se pelo menos três medidas de cada animal para se obter a média.

3.9 Eutanásia e coleta de órgãos

Ao final do protocolo (oito semanas), os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação sob anestesia geral com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), via intraperitoneal, seguida de excisão rápida do coração inteiro para as análises posteriores. Os corações foram coletados em diástole para análise histológica (medida da espessura das paredes e tamanho das câmaras). Para tanto, foram introduzidos ainda batendo em solução isosmótica de KCl (150 mM) e permaneceram nessa solução até pararem de bater. Logo após, os corações foram retirados da solução, secos, pesados e fotografados em papel milimetrado para análise macroscópica.

Outros órgãos foram coletados e pesados para avaliar a interferência da dieta HC ou da glibenclamida em seu peso. Pulmões, baço, rins, fígado e pâncreas foram retirados e imediatamente pesados. O peso de todos os órgãos foi corrigido pelo comprimento da tibia direita, medido em paquímetro, e usado para inferir hipertrofia ou edema.

Para avaliação da adiposidade, os depósitos adiposos mesentérico, epididimal e retroperitoneal foram retirados e pesados para a avaliação do índice de adiposidade, pela fórmula: índice de adiposidade % = (soma dos pesos dos depósitos adiposos/ peso do animal) x 100 (Oliveira, Menezes-Garcia et al. 2013).

3.10 Análise histológica

Os corações foram fixados em paraformaldeído 4% em PBS por 24 horas e depois foram mantidos em álcool 70% v/v até a inclusão em parafina. Antes da inclusão em parafina, as amostras foram submetidas à desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico, logo após, passaram por diafanização em xilol para em seguida passarem por três banhos de parafina para finalmente serem incluídas na parafina. Foram feitos cortes de 5 µm para coloração de Hematoxilina & Eosina, para as análises morfométricas.

3.10.1 Análise morfométrica cardíaca

Lâminas coradas da porção média de cortes transversais foram fotografadas para a análise da área da câmara ventricular esquerda (ACVE), da área de secção transversa (AST), espessura da parede (EP), com auxílio do programa ImageJ (Cau, Guimaraes et al. 2015). Para tanto, o ventrículo esquerdo foi considerado um círculo, cuja área = $\pi.r^2$, onde r é o raio da câmara. A AST foi obtida através da subtração da área total do ventrículo esquerdo pela

área da câmara do ventrículo esquerdo. A espessura ventricular esquerda foi obtida pela subtração do raio total (r_1) pelo raio da câmara (r_2), demonstrados na figura 4.

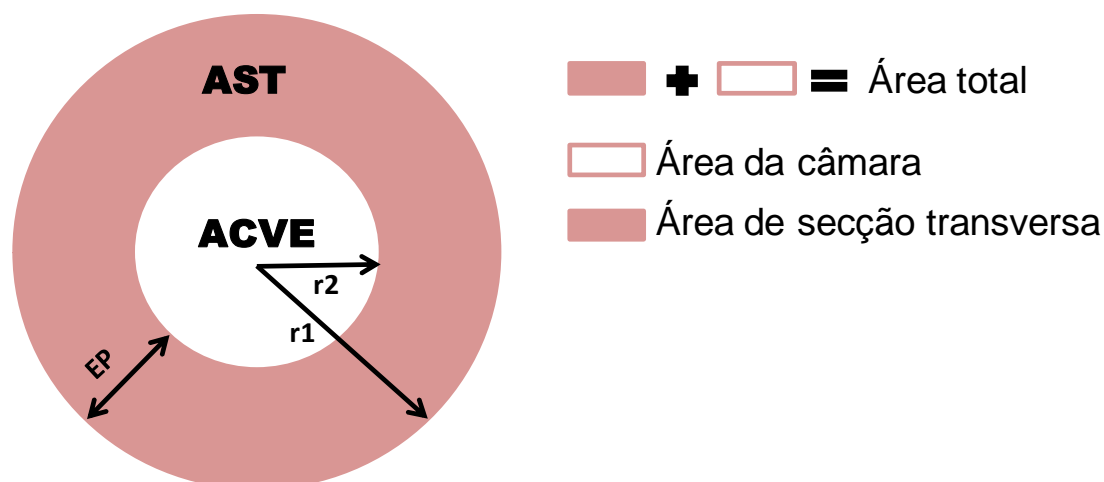


Figura 4: Representação esquemática e cálculo morfometria cardíaca. Representação esquemática do corte transversal do ventrículo esquerdo na porção média do órgão, e dimensões quantificadas. ACVE = área da câmara ventricular esquerda, mm²; AST = área de secção transversa da parede da câmara, mm²; EP = espessura da parede, mm; r_1 = raio total; r_2 = raio da câmara.

3.11 Função ventricular esquerda *in vivo*

Para avaliação da função cardíaca *in vivo*, o ventrículo esquerdo foi canulado (Zhang, Davis et al. 2015). Para tanto, os animais foram anestesiados com mistura anestésica contendo cetamina 60mg/kg e uretana 0,7g/kg, por via intraperitoneal (Kawahara, Tanonaka et al. 2005, Pacher, Nagayama et al. 2008). Antes da anestesia administrou-se 100U/Kg de heparina, via intraperitoneal, e 200 μ L de salina 0,9%, via subcutânea. Os animais foram mantidos aquecidos por uma lâmpada durante todo o experimento. Uma vez anestesiado, foi realizada uma secção sobre o pescoço do animal para a realização de uma traqueostomia, para evitar o sufocamento por muco nas vias respiratórias causado pela anestesia. Após a traqueostomia, iniciou-se a canulação da artéria carótida direita. Para a canulação da artéria, foram utilizadas cânulas de polietileno PE-50 e PE-10 (8cm e 3cm respectivamente) soldadas uma a outra. Antes de serem usadas, as cânulas foram preenchidas com salina 0,9% e heparina, e foram obstruídas na extremidade da PE-50 por pinos de metal. Após a canulação da artéria, a cânula foi conectada a um transdutor de pressão. A pressão arterial média, sistólica e diastólica foram medidas por cinco minutos, após estabilização. Em seguida, a cânula foi introduzida até o ventrículo esquerdo para o registro direto da frequência cardíaca, pressão no ventrículo esquerdo e cálculo das derivadas de pressão dP/dt máxima (dP/dt_{max}) e mínima (dP/dt_{min}). Todas as medidas foram determinadas pelo sistema de aquisição de dados análogo digital

(Biopac Systems, Inc.), usando o programa de computador Acqknowledge (Biopac Systems, Inc.), após prévia calibração do equipamento.

3.12 Detecção de caspase-1 ativa

A detecção de caspase-1 ativa *in situ* foi obtida com a utilização do kit FLICA FAM-YVAD-FMK (Immunochemistry), de acordo com as instruções do fabricante. Este kit é composto por uma sonda fluorescente que se liga de forma irreversível à uma subunidade específica de caspase-1 clivada. Resumidamente, as lâminas de criosecções de coração de 5 μ M foram incubadas por uma hora com o reagente FLICA diluído em PBS 1:50 a 37°C protegido da luz. Após, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos cada vez. As lamínulas foram invertidas sobre os cortes em meio de montagem contendo DAPI, marcador de núcleo, em lâminas para microscopia de fluorescência e imagens foram adquiridas com o microscópio (ZEISS Imager.A2) com ampliação de 20 vezes. A intensidade de fluorescência verde foi quantificada e expressa por área de tecido por meio do programa ImageJ.

3.13 Quantificação do infiltrado de macrófagos

Amostras de ventrículo esquerdo dos camundongos foram submetidos ao método de ensaio enzimático para quantificar a atividade da n-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG). Os tecidos foram ressuspensos em solução salina 0,9% (4° C) contendo 0,15 v/v de Triton X-100 (Merck). Logo em seguida, foram homogeneizados em vortex e centrifugados a 4° por 10 minutos a 1500 rpm. Os sobrenadantes foram imediatamente recolhidos e utilizados para o ensaio de NAG com diluição de 1:10. A reação foi iniciada após a adição de 100 μ L do sobrenadante recolhido após centrifugação e adição de 100 μ L de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminidina (Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1M; Na₂HPO₄ 0,1 M; pH 4,5) na concentração final de 2,24 mM. A reação foi processada a 37°C por 10 minutos, em placas de 96 poços. O término da reação foi dado pela adição de 100 μ L de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6). As placas de 96 poços foram lidas em espectrofotômetro de placa (Emax, Molecular Devices) a 400 nm. O número de macrófagos foi calculado a partir de uma curva padrão da atividade de NAG expressa em aumento de absorbância a partir de macrófagos obtidos no tecido. Os resultados foram expressos em número relativo de macrófagos por miligrama (mg) de tecido.

3.14 Análises estatísticas

Os valores das variáveis são apresentados como média \pm erro padrão da média. Os testes estatísticos empregados foram teste t não pareado, análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, conforme a necessidade (indicado na legenda das figuras). Os valores de P menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4- RESULTADOS

4.1 Caracterização das alterações cardíacas induzidas por dieta HC

4.1.1 Alterações morfofuncionais cardíacas

A fim de se avaliar se a dieta HC causaria alterações cardíacas morfológicas e funcionais, o ecocardiograma foi realizado com animais dos grupos controle e do que consumiu dieta HC por oito semanas. A dieta HC aumentou a espessura do septo e do ventrículo esquerdo (VE) na diástole (tabela 1). Embora não se tenha encontrado diferença significativa em outros parâmetros morfológicos e funcionais, vale destacar uma tendência em aumentar a massa do ventrículo esquerdo e diminuir fração e volume de ejeção nos animais submetidos à dieta HC.

	Controle	Dieta HC	Valor de P
<i>Parâmetros estruturais</i>			
Espessura septal diástole (mm)	0,55 ± 0,02	0,64 ± 0,01*	0,01
Espessura septal sístole (mm)	0,85 ± 0,04	0,82 ± 0,03	0,65
Espessura VE diástole (mm)	0,57 ± 0,04	0,72 ± 0,03*	0,02
Espessura VE sístole (mm)	0,85 ± 0,06	0,90 ± 0,06	0,52
Diâmetro câmara VE diástole (mm)	3,91 ± 0,09	3,88 ± 0,09	0,80
Diâmetro câmara VE sístole (mm)	2,68 ± 0,20	2,88 ± 0,15	0,45
Massa do VE (mg)	82,7 ± 6,0	96,6 ± 4,1	0,08
<i>Parâmetros funcionais</i>			
Débito cardíaco (mL/min)	16,6 ± 1,5	15,1 ± 0,9	0,42
Fração de ejeção (%)	62,1 ± 5,7	48,8 ± 3,9	0,08
Fração de encurtamento (%)	31,7 ± 4,1	24,4 ± 2,3	0,15
Volume de ejeção (µL)	38,9 ± 2,8	32,9 ± 1,8	0,09
Volume diástole (µL)	66,8 ± 3,9	65,5 ± 3,8	0,81
Volume sístole (µL)	27,9 ± 4,5	32,6 ± 4,4	0,47
Frequência cardíaca (bpm)	424 ± 19	448 ± 14	0,33

Tabela 1: Efeitos da dieta HC sobre parâmetros estruturais e funcionais no ecocardiograma. N=6, *P<0,05 vs. Controle. Teste *t* não pareado.

4.1.2 Ativação do inflamassoma NLRP3

A fim de se avaliar se a dieta HC induziria à ativação do inflamassoma NLRP3 no coração, foram avaliadas as expressões do receptor NLRP3 e da citocina IL-1 β nos corações dos animais que se alimentaram da dieta por quatro e oito semanas (4s e 8s, respectivamente). Conforme a figura 5, a dieta HC induziu o aumento da expressão de NLRP3 após oito semanas. Além disso, a quantidade de IL-1 β clivada em relação à pró-IL-1 β , que é um marcador de atividade do inflamassoma NLRP3, é maior nos corações dos animais que consumiram a dieta HC por oito semanas.

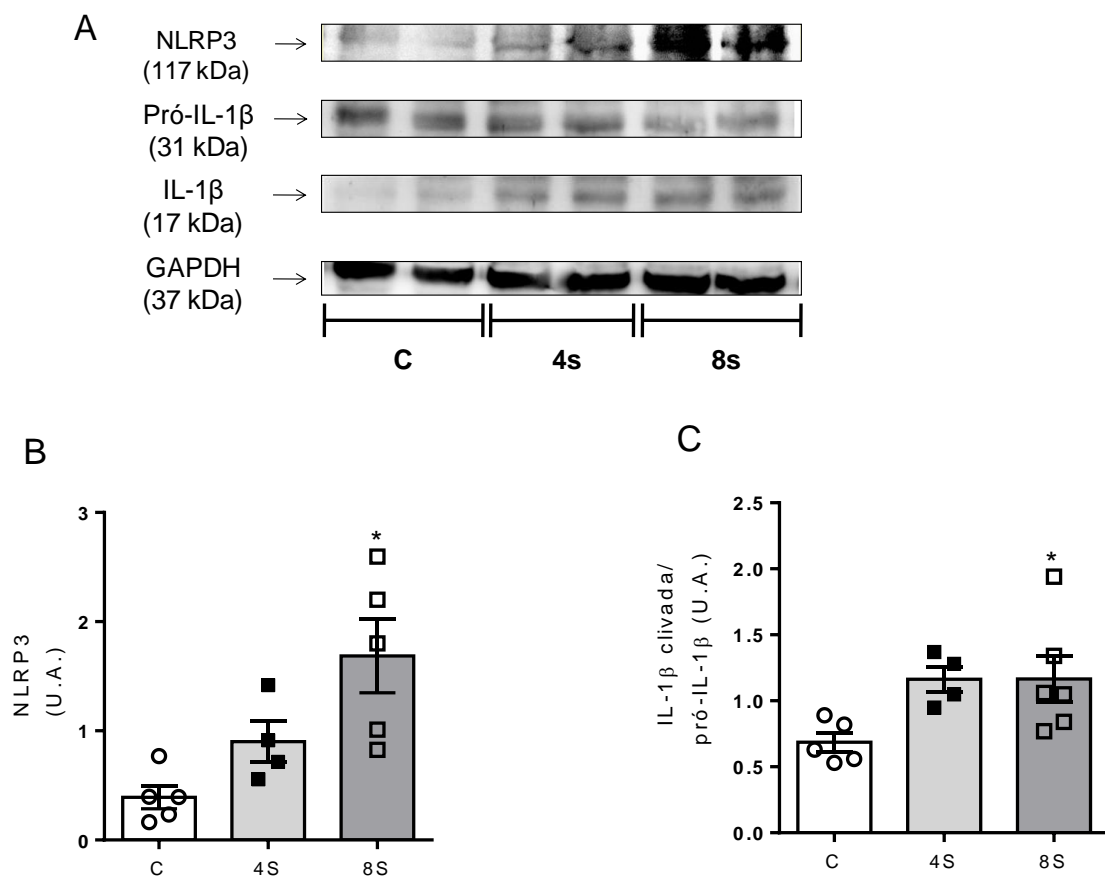


Figura 5: Expressão da proteínas NLRP3 e IL-1 β . Imagem representativa da membrana de *western blot* (A). Níveis protéicos de NLRP3 (B) e IL-1 β (C), formas imatura (pró-IL-1 β) e clivada ou madura (IL-1 β), no ventrículo esquerdo. N=5, *P<0,05 vs. C. ANOVA de uma via, seguida de teste múltiplo de Dunnett.

A partir da observação que há indícios da ativação cardíaca do inflamassoma NLRP3 que coincidem com alterações morfofuncionais cardíacas induzidas pela dieta HC, definimos iniciar a inibição do inflamassoma NLRP3 a partir da quarta semana, a fim de verificar seus efeitos sobre as alterações cardíacas causadas pela dieta HC.

4.2 Efeitos da glibenclamida (5 mg/kg) sobre parâmetros biométricos e de homeostasia da glicose

A estratégia farmacológica escolhida para inibir a ativação cardíaca do inflamassoma NLRP3 induzida pela dieta HC foi o tratamento com glibenclamida. Foi definida a menor dose, 5 mg/kg, a qual é considerada não hipoglicemiante e eficaz sobre o inflamassoma NLRP3 (Cai, Lu et al. 2014). Contudo, por se tratar de um fármaco antidiabético e que, portanto, poderia se associar à melhora das alterações metabólicas, os efeitos do tratamento sobre parâmetros biométricos e de homeostasia da glicose foram avaliados.

Não houve diferença no peso corporal final entre os quatro grupos (figura 6 A). Entretanto, a dieta HC aumentou o índice de adiposidade de ambos os grupos submetidos à dieta HC, HCV e HCG (figura 6 B), indicando que glibenclamida nesta dose não altera o ganho de gordura visceral induzido pela dieta HC. O consumo cumulativo de ração foi similar entre os grupos (dados não mostrados), medido de forma indireta, sem o uso de gaiola metabólica.

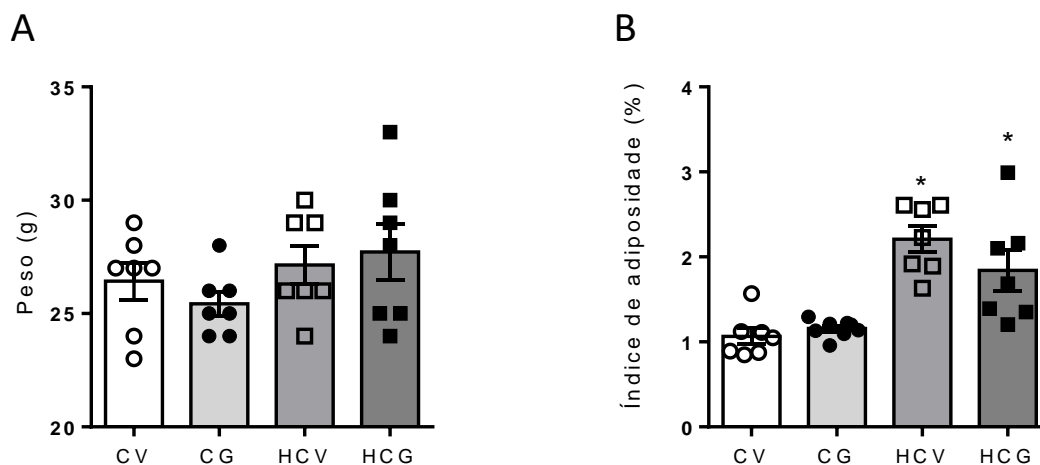


Figura 6: Efeitos da glibenclamida (5 mg/kg) sobre parâmetros biométricos. Efeitos da dieta HC e do tratamento com GBC sobre o (A) peso corporal e (B) índice de adiposidade. N=7, *P<0,05 vs. CV. ANOVA de duas vias, seguida de teste múltiplo de Bonferroni.

Os testes de resistência à insulina (TRI) e tolerância oral a glicose (TTOG) foram realizados após quatro (figura 7) e oito (figura 8) semanas de dieta HC, isto é: antes e após o tratamento com a glibenclamida, respectivamente.

Na 4ª semana do protocolo, a dieta causou resistência à insulina, sendo que o grupo HC apresentou glicemia elevada no tempo 0 e 120 minutos após a administração de insulina (figura 7 A) e aumento da área sob a curva (ASC) do TRI (figura 7 B) em relação ao controle.

No teste de tolerância oral à glicose, a dieta aumentou a glicemia em jejum e 15 minutos após a administração de glicose (figura 7 C). Não houve diferença entre os grupos na ASC no TTOG (D).

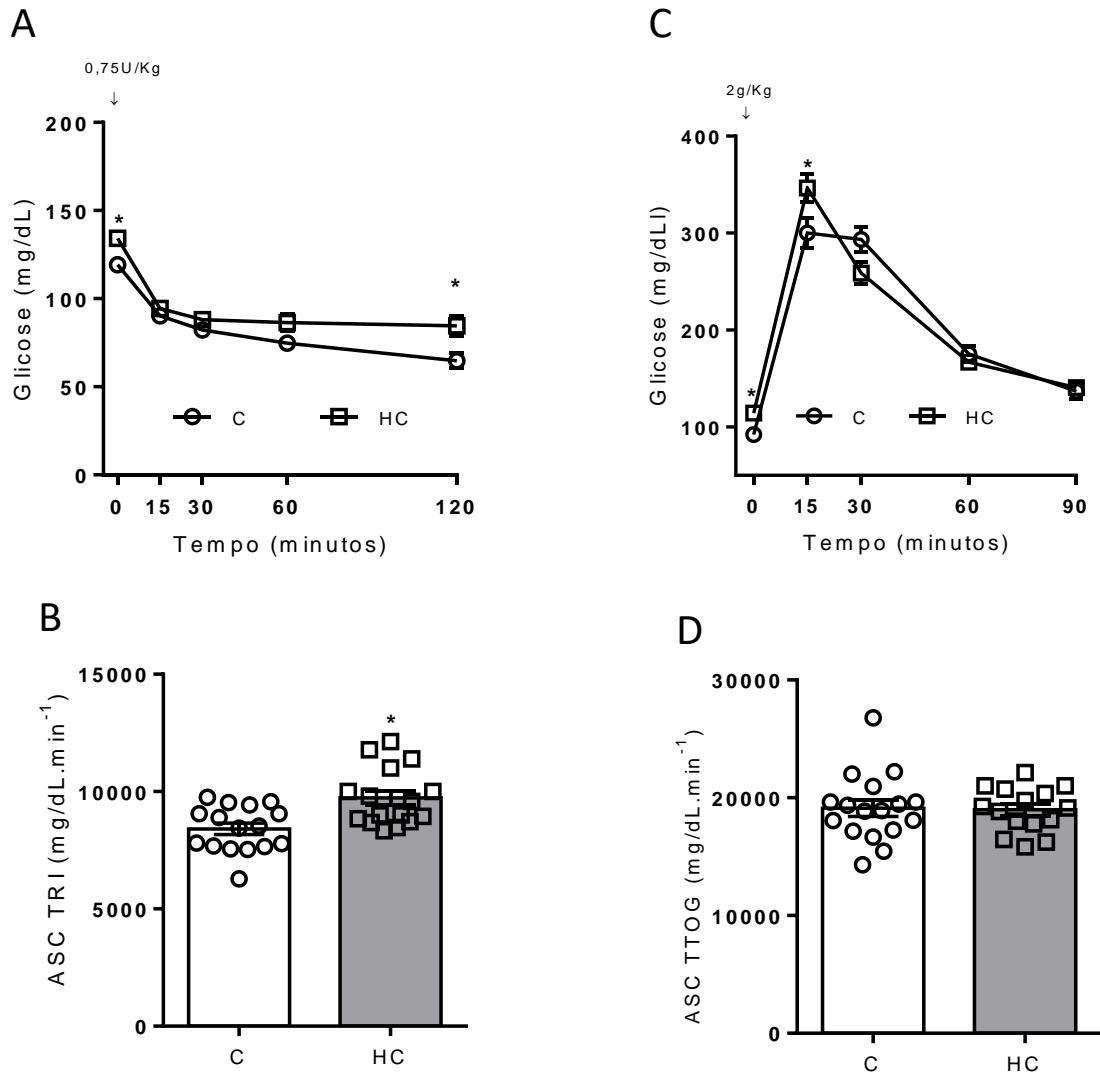


Figura 7: Parâmetros de homeostasia da glicose antes do tratamento com glibenclamide (5mg/kg). Teste de resistência à insulina (TRI) em (A) e área sob a curva (ASC) em (B) e teste de tolerância oral a glicose (TTOG) em (C) e ASC em (D) realizados após quatro semanas de dieta HC. N=16 *P<0,05 vs. C. Teste t não pareado.

Os testes metabólicos realizados também não apresentaram interferência da glibenclamide na dose de 5mg/kg em seus resultados. Após o tratamento com glibenclamide (8ª semana), o TRI foi repetido e a glicemia em jejum foi realizada (figura 8). O grupo HCG apresentou glicemia elevada no basal (0 minuto) e após 30 minutos da administração à insulina em relação ao grupo controle veículo, enquanto que os valores de glicemia após a administração de insulina do grupo HCV não alcançaram significância estatística (figura 8 A).

Semelhantemente, a ASC do TRI foi significativamente maior apenas no grupo HCG (figura 8 B). Não houve diferença entre os quatro grupos na glicemia em jejum (Figura 8 C).

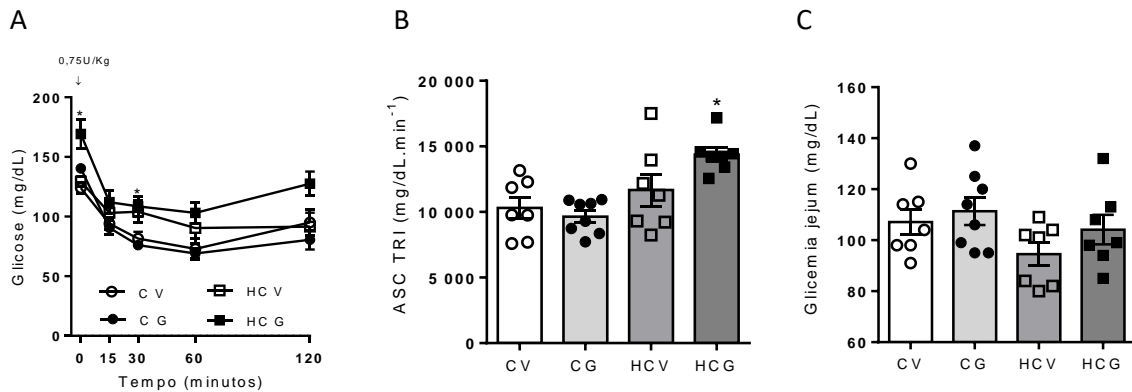


Figura 8: Parâmetros de homeostasia da glicose após o tratamento com glibenclamide (5mg/kg). Teste de resistência à insulina (TRI) (A) e área sob a curva (ASC) (B) e teste de glicemia em jejum (C) ao final das oito semanas. N=7 *P<0,05 vs. CV. ANOVA de duas vias, seguida de teste múltiplo de Bonferroni.

Esses resultados ao final de oito semanas (figura 8), somados aos resultados da quarta semana (figura 7), demonstram que a dieta HC causa alterações sutis no metabolismo da glicose e que glibenclamide na dose de 5mg/kg não melhora a resistência à insulina induzida pela dieta HC.

4.3 Efeitos da glibenclamide (5mg/kg) sobre parâmetros cardiovasculares.

Para verificar se a dieta HC ou a droga causariam alguma mudança na pressão arterial dos animais, foram feitas medidas de pressão arterial por pletismografia de cauda. Não houve diferença na pressão arterial sistólica dos animais dos quatro grupos antes do início da dieta (0), após quatro semanas de dieta e antes do tratamento (4s) e ao final da dieta HC e do tratamento (8s) (figura 9), excluindo a hipótese de que qualquer alteração cardíaca pudesse ser consequência de um aumento na pressão arterial.

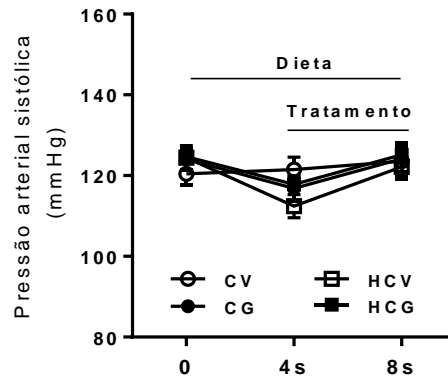


Figura 9: Pressão arterial sistólica glibenclamida (5 mg/kg). Medida da pressão arterial sistólica medida por pletismografia de cauda antes de iniciar a dieta HC (0), com quatro semanas de dieta HC (4s) e após o tratamento de quatro semanas com GBC (8s). N=7, *P<0,05 vs. CV. ANOVA de duas vias seguida de teste múltiplo de Bonferroni.

A dieta HC aumentou o peso do coração e a glibenclamida na dose de 5mg/kg não reverteu o aumento de peso do coração induzido pela dieta HC (figura 10 A). Não houve diferença no peso do pulmão entre os grupos (figura 10 B), entretanto como o peso de pulmão é uma medida pouco sensível, e aparece alterado em modelos onde há comprometimento da fração de ejeção, o fato de não ter apresentado diferença com a dieta HC não indica ausência de congestão circulatória, pois isso deveria ser averiguado por métodos mais sensíveis de mensurar extravasamento de plasma para os tecidos.

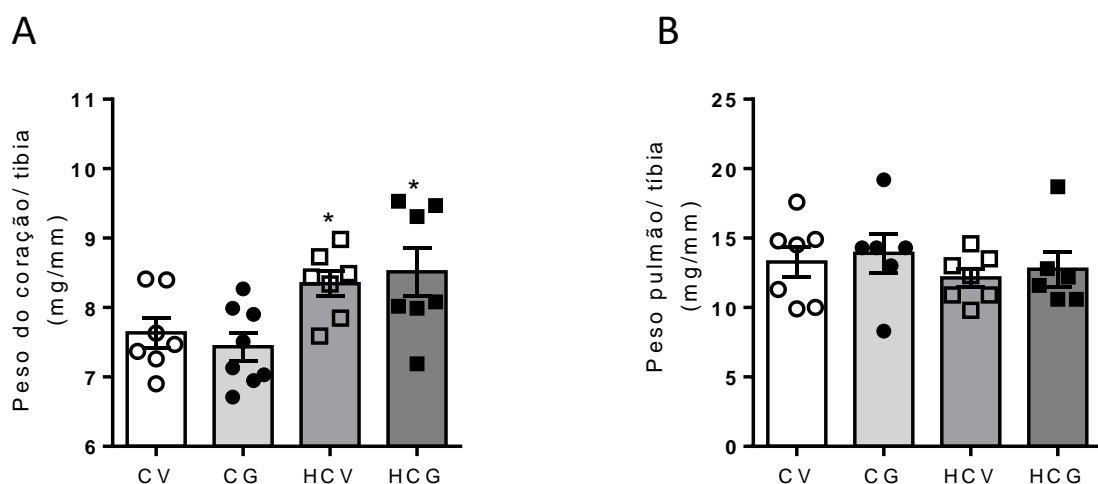


Figura 10: Efeitos da glibenclamida (5mg/kg) sobre a hipertrofia cardíaca. Peso do coração corrigido pelo comprimento da tibia direita (A). Peso do pulmão corrigido pelo comprimento da tibia direita (B). N=7 *P<0,05 vs. CV. ANOVA de duas vias, seguida de teste múltiplo de Bonferroni.

A fim de verificar se o aumento do peso se tratava de uma alteração causada pela dieta HC apenas no coração, os demais órgãos foram pesados. A dieta HC = não causou diferença no peso do fígado, rim direito, rim esquerdo e baço. Entretanto a dieta HC diminuiu o peso do pâncreas (tabela 2). Nenhum destes órgãos foi alterado pelo tratamento com glibenclamida (5mg/kg).

	CV	CG	HCV	HCG
Fígado	68,4 ± 2,4	60,0 ± 1,6	67,1 ± 1,9	65,5 ± 3,6
Rim direito	10,8 ± 0,5	10,5 ± 0,3	10,8 ± 0,3	11,2 ± 0,6
Rim esquerdo	10,6 ± 0,4	10,2 ± 0,3	10,6 ± 0,3	11,2 ± 0,6
Baço	6,7 ± 0,3	7,5 ± 0,5	7,7 ± 0,3	8,1 ± 0,6
Pâncreas	14,2 ± 0,4	13,5 ± 0,4	11,5 ± 0,9*	11,6 ± 0,5*

Tabela 2: Efeitos da glibenclamida (5mg/kg) sobre o peso dos órgãos. Peso dos órgãos corrigidos pelo comprimento da tibia direita (mg/mm). N=7, *P<0,05 vs. CV. ANOVA de duas vias, seguido de teste múltiplo de Bonferroni.

Até este ponto, definiu-se como parâmetro padrão de eficácia do tratamento sobre a reversão de dano cardíaco o peso cardíaco. Uma vez que a menor dose de glibenclamida (5 mg/kg) não causou efeito satisfatório sobre este parâmetro, decidimos aumentar para a dose de 20 mg/kg, que também é considerada não-hipoglicemiante e com efeitos inibitórios sobre inflamassoma NLRP3 (Cai, Lu et al. 2014).

4.4 Efeito da glibenclamida (20mg/kg) sobre parâmetros biométricos e de homeostasia da glicose

Os grupos tiveram consumo de ração semelhante entre, mostrando que o consumo das dietas não é modificado pela glibenclamida. Não houve diferença no peso dos animais entre os quatro grupos (figura 11 A), entretanto houve aumento na adiposidade dos grupos que consumiram a dieta HC e a glibenclamida (20 mg/kg) não interferiu nesse parâmetro (figura 11 B).

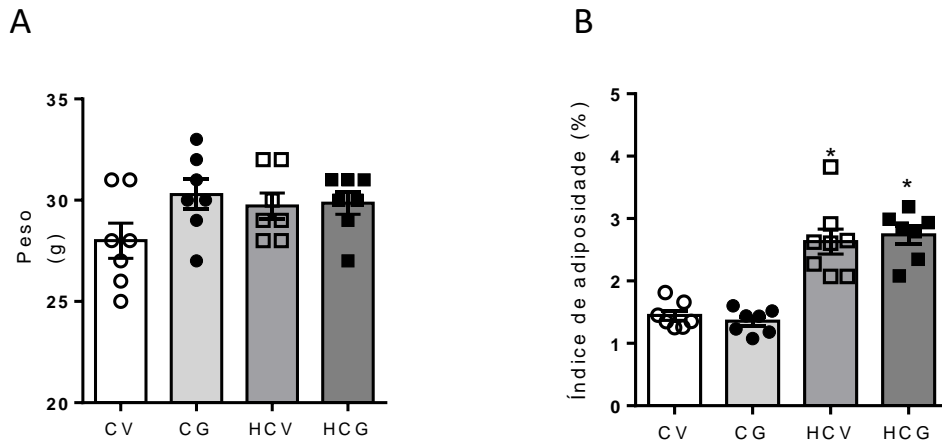


Figura 11: Efeitos da glibenclamida (20 mg/kg) sobre parâmetros biométricos. Peso final dos animais (A). Índice de adiposidade (B). N=7 *P<0,05 vs. CV. ANOVA de duas vias, seguida de teste múltiplo de Bonferroni.

A dieta HC causou resistência à insulina com quatro semanas de dieta (figura 12 A e B). Após o tratamento, os grupos HCV e HCG apresentaram resistência à insulina 120 minutos após a administração da insulina (figura 12 C e D), portanto a glibenclamida na dose de 20mg/kg não interferiu nesse parâmetro metabólico. Não houve diferença na glicemia em jejum entre os grupos ao final do tratamento (figura 12 E).

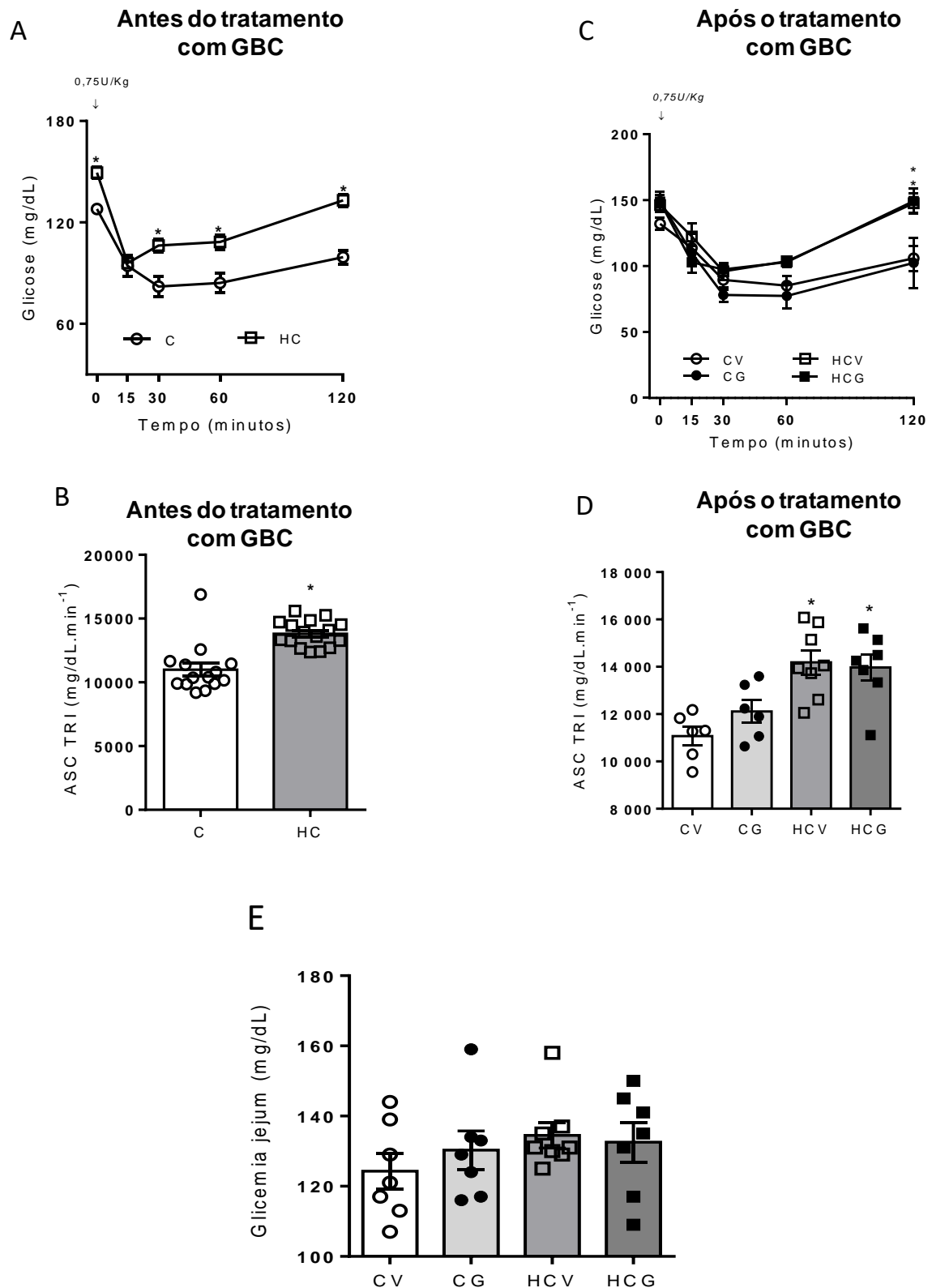


Figura 12: Efeitos da glibenclamida (20 mg/kg) na homeostasia da glicose. Alterações na homeostasia da glicose induzidas pela dieta HC e o efeito do tratamento com glibenclamida (GBC) (20 mg/kg). Teste de resistência à insulina (TRI) realizado com quatro semanas de dieta HC (A) e a área sob a curva (ASC) do TRI após quatro semanas (B). N=16 *P<0,05 vs. C. Teste *t* não pareado. TRI realizado com oito semanas de dieta HC (C) e ASC do TRI após oito semanas (D). Medida da glicemia em jejum com oito semanas (E). N=7 *P<0,05 vs. CV. ANOVA de duas vias, seguida de teste múltiplo de Bonferroni.

4.5 Efeitos da glibenclamida (20 mg/kg) sobre parâmetros cardiovasculares

Não houve diferença na pressão arterial sistólica dos animais ao final da dieta HC e do tratamento (figura 13), excluindo a hipótese de que qualquer alteração cardíaca pudesse ser consequência de um aumento na pressão arterial.

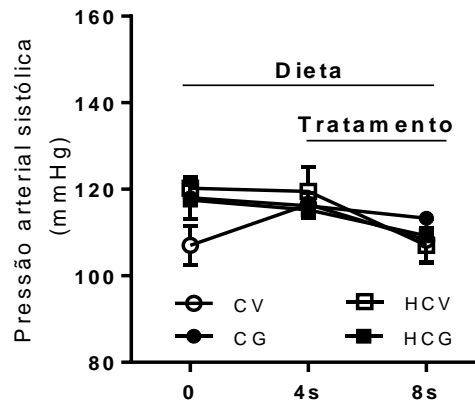


Figura 13: Pressão arterial sistólica glibenclamida (20 mg/kg) Medida da pressão arterial sistólica por pletismografia de cauda antes de iniciar a dieta (0), com quatro semanas de dieta HC (4s) e após o tratamento com glibenclamida (8s). N=7 *P<0,05 vs. CV. ANOVA de duas vias, seguida de teste múltiplo de Bonferroni.

Macroscopicamente, os corações do grupo HCV eram maiores em relação aos outros grupos (figura 14 A). Paralelamente, foi verificado aumento do peso do órgão, indicando uma hipertrofia do coração no grupo HCV. A glibenclamida na dose de 20 mg/kg reverteu a hipertrofia cardíaca observada no grupo HCG (figura 14 B). Não houve novamente diferença no peso do pulmão entre os grupos (figura 14 C).

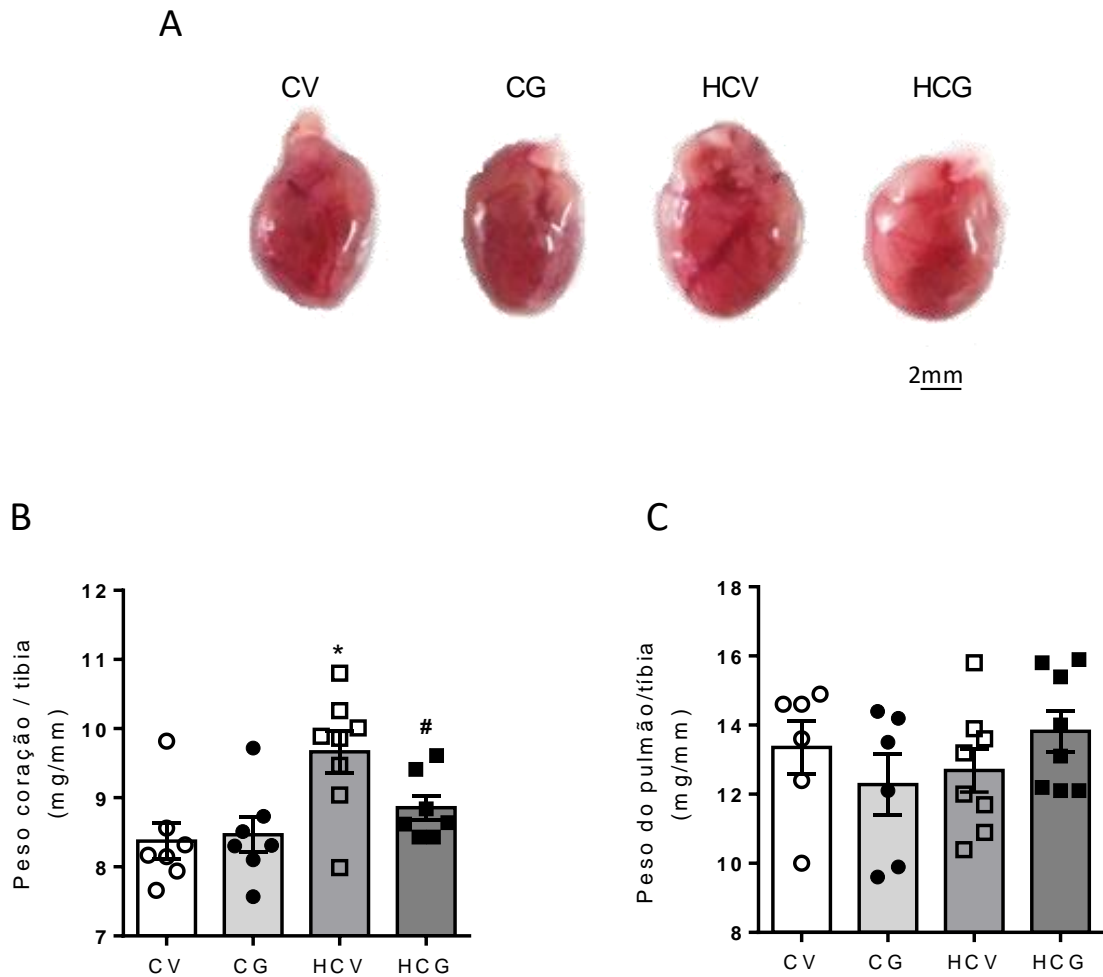


Figura 14: Efeitos da glibenclamida (20 mg/kg) sobre a hipertrofia cardíaca Imagem macroscópica representativa de um coração por grupo (A). Peso do coração corrigido pelo comprimento da tibia direita (B); peso dos pulmões corrigido pelo comprimento da tibia direita (C). N=7 *P<0,05 vs. CV. #P<0,05 vs. HCV. ANOVA de duas vias, seguida de teste múltiplo de Bonferroni.

Não houve aumento de peso em outros órgãos, somente no coração. O grupo HCV teve o peso do pâncreas diminuído novamente, entretanto o grupo HCG não apresentou esta redução, (tabela 3).

	CV	CG	HCV	HCG
Fígado	75,8 ± 2,6	80,5 ± 2,8	72,7 ± 1,9	82,6 ± 2,8
Rim direito	11,9 ± 0,3	11,8 ± 0,3	13,1 ± 0,3	12,3 ± 0,2
Rim esquerdo	11,8 ± 0,3	11,7 ± 0,4	12,8 ± 0,2	12,4 ± 0,2
Baço	7,4 ± 0,1	8,1 ± 0,4	7,9 ± 0,3	7,7 ± 0,2
Pâncreas	17,5 ± 0,6	17,7 ± 0,8	14,6 ± 0,9*	17,3 ± 0,2

Tabela 3: Efeitos da glibenclamida (20 mg/kg) sobre o peso dos órgãos Peso dos órgãos removidos e pesados após oito semanas de protocolo. N=7 *P<0,05 vs. CV. ANOVA de duas vias, seguida de teste múltiplo de Bonferroni.

A fim de verificar como a dieta HC modificaria a morfologia cardíaca, foi realizada a quantificação das dimensões do ventrículo esquerdo nas lâminas de cortes transversais da porção média do coração (figura 15 A). A dieta HC causou redução da câmara (figura 15 B), acompanhado de um aumento da área de secção transversa (AST) (figura 15 C) e espessamento das paredes (figura 15 D). A câmara do ventrículo diminui enquanto a AST aumenta, caracterizando uma hipertrofia concêntrica. A glibenclamida diminui a AST e a espessura das paredes no grupo HCG.

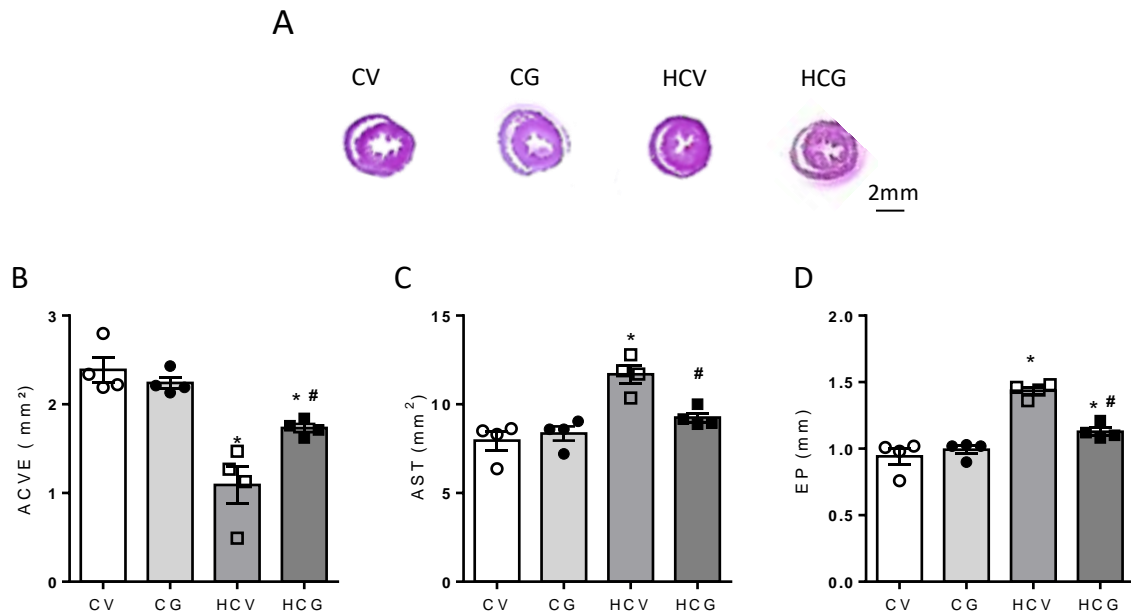


Figura 15: Morfometria cardíaca Imagem de cortes transversais de coração corados com hematoxilina e eosina, com imagem representativa de cada grupo (A). Quantificações das medidas da área da câmara ventricular esquerda (ACVE) (B), da área de secção transversa (AST) (C) e da espessura da parede (EP) (D). N=4 *P<0,05 vs. CV. #P<0,05 vs. HCV. ANOVA de duas vias, seguida de teste múltiplo de Bonferroni.

Para verificar se essa hipertrofia cardíaca alteraria algum parâmetro funcional, foi realizado teste *in vivo* da função cardíaca por meio da canulação da artéria carótida direita nos animais anestesiados. Antes de atingir o ventrículo esquerdo, a pressão arterial foi registrada pelo catéter na artéria carótida. Não houve diferença na pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) (figura 16), corroborando com os dados medidos na pletismografia de cauda (figura 13).

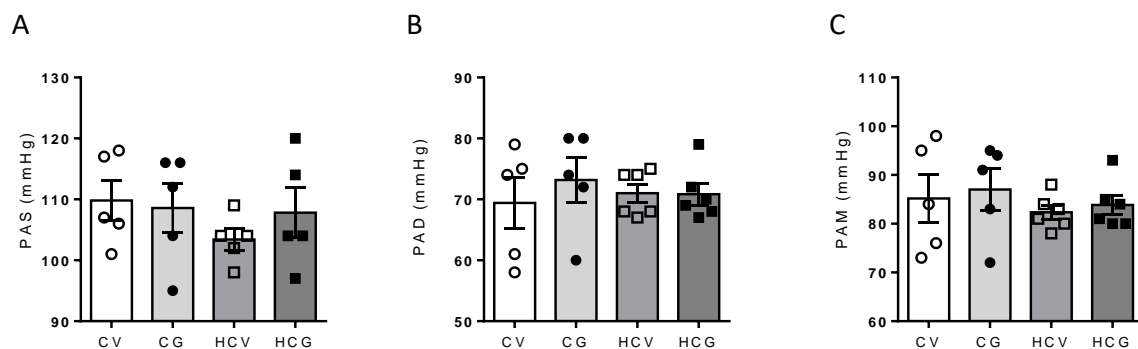


Figura 16: Medida invasiva da pressão arterial Pressão arterial sistólica (PAS) (A), pressão arterial diastólica (PAD) (B) e pressão arterial média (PAM) (C). N=5 *P<0,05 vs. CV. ANOVA de duas vias, seguida de teste múltiplo de Bonferroni.

Uma vez posicionado no ventrículo esquerdo, o cateter permitiu a medida da pressão ventricular esquerda (PVE) e o cálculo em tempo real das derivadas de pressão máxima (dP/dt_{\max}) e mínima (dP/dt_{\min}) pela derivada tempo. As dP/dt máxima (figura 17 A) e mínima (17 B) apresentaram queda com o consumo da dieta HC, entretanto essa queda foi revertida com o tratamento com glibenclamida no grupo HCG (figura 17 A e B). A pressão ventricular esquerda do grupo HCV se mostrou reduzida em relação ao grupo HCG (figura 17 C).

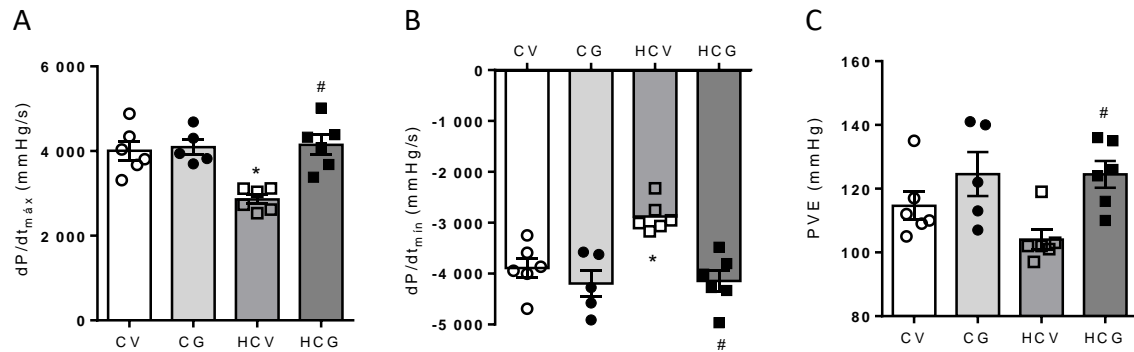


Figura 17: Avaliação invasiva da função cardíaca: Derivada da pressão pela derivada do tempo máxima, na sístole (dP/dt_{\max}) (A), derivada da pressão pela derivada do tempo mínima na diástole (dP/dt_{\min}) (B), pressão ventricular esquerda (PVE), (C). N=6 *P<0,05 vs. CV. #P<0,05 vs. HCV. ANOVA de duas vias, seguida de teste múltiplo de Bonferroni.

4.6 A dieta HC aumentou a atividade da caspase-1 *in situ* e a glibenclamida reduziu essa ativação.

Para determinar a ativação do inflamassoma NLRP3 e o efeito do tratamento sobre a mesma, cortes de coração foram incubados com o substrato fluorescente da caspase-1 ativa. Uma maior atividade da caspase-1 significa uma maior ativação do inflamassoma NLRP3. Conforme mostrado nas figuras 18 e 19, a dieta HC aumentou a atividade da caspase-1 no grupo HCV, tanto na parede ventricular esquerda (figura 18) como na parede septal (figura 19). Houve um aumento no sinal de fluorescência no grupo CG. Contudo, quando a fluorescência relativa entre os grupos CV *vs.* HCV e CG *vs.* HCG é quantificada, observamos que, mesmo partindo de uma alta fluorescência (CG), o tratamento com glibenclamida reduz a atividade de caspase-1 induzida por dieta HC (HCG).

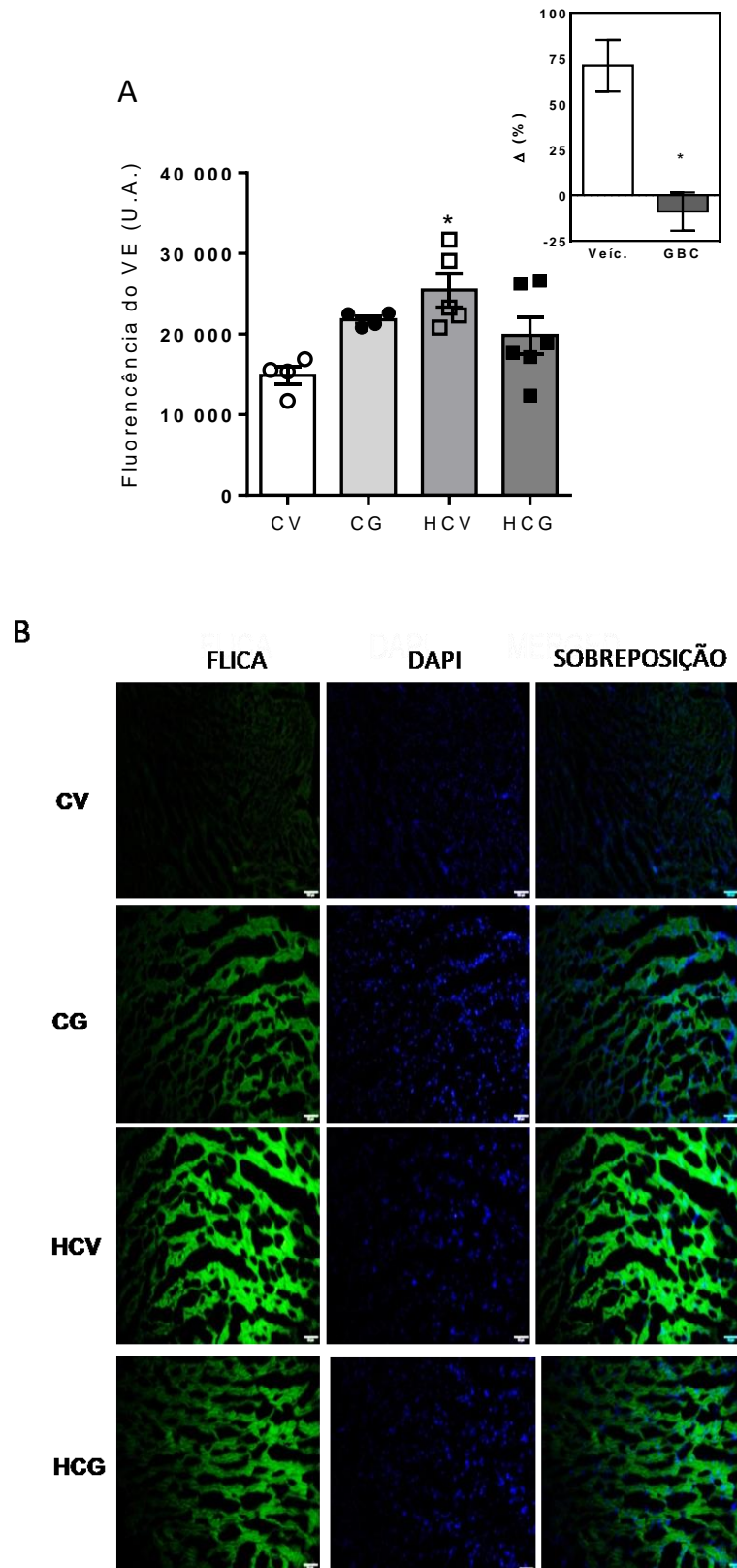


Figura 18: Fluorescência da caspase-1 no ventrículo esquerdo Ativação do inflamassoma NLRP3 no ventrículo esquerdo, determinada por marcação fluorescente da caspase-1 ativa. Quantificação da fluorescência emitida pelo substrato fluorescente da caspase-1 ativa, FLICA, em (A). Imagens representativas de cortes de VE mostrando fluorescência verde do FLICA, azul do DAPI, marcador de núcleo, e a sobreposição das imagens, em B. N=6 *P<0,05 vs. CV. ANOVA de duas vias, seguida de teste múltiplo de Bonferroni.

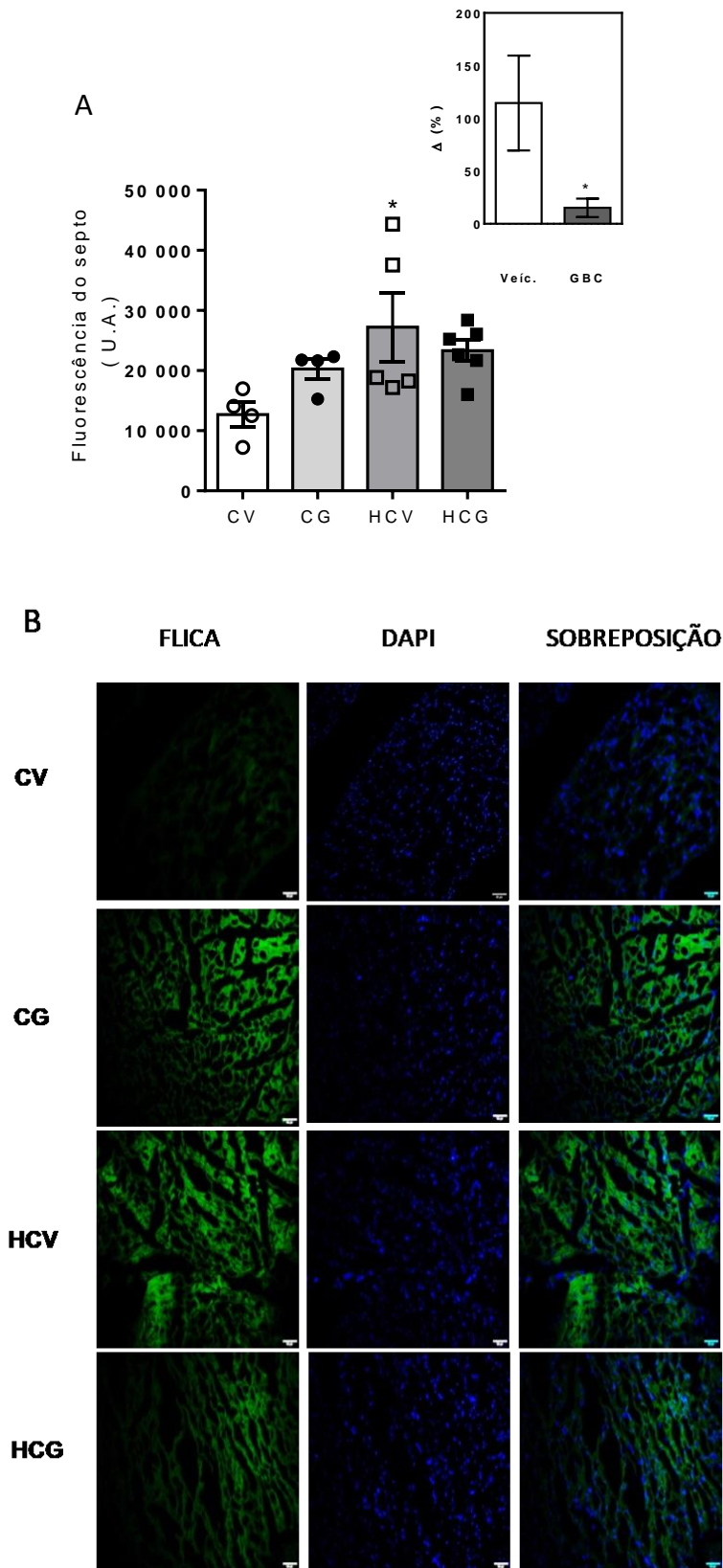


Figura 19: Fluorescência da caspase-1 no septo. Ativação do inflamassoma NLRP3 no septo, determinada por marcação fluorescente da caspase-1 ativa. Quantificação da fluorescência emitida pelo substrato fluorescente da caspase-1 ativa, FLICA, em (A). Imagens representativas de cortes de septo mostrando fluorescência verde do FLICA, azul do DAPI, marcador de núcleo, e a sobreposição das imagens, em B. N=6 *P<0,05 vs. CV. ANOVA de duas vias, seguida de teste múltiplo de Bonferroni.

O inflamassoma NLRP3 é um mecanismo classicamente descrito em células da imunidade inata, como os macrófagos, embora também se admita sua ativação em outros tipos celulares (não associados ao sistema imune). Assim, nós nos perguntamos se haveria um infiltrado de macrófagos nos corações induzido pela dieta HC. Não houve diferença entre os grupos no número relativo de macrófagos no ventrículo esquerdo (figura 20), sugerindo que a ativação do inflamassoma NLRP3 tenha ocorrido nas células do miocárdio e não de um infiltrado celular.

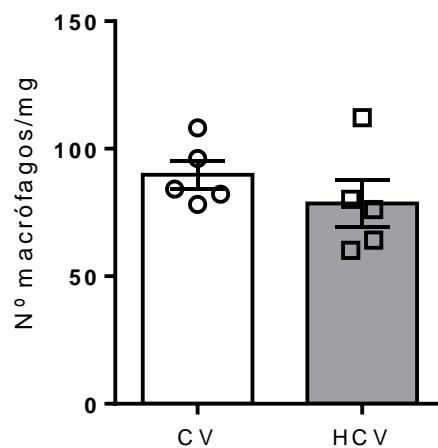


Figura 20: Infiltrado de macrófagos: Número relativo de macrófagos por miligrama de tecido de ventrículo esquerdo. N=5 *P<0,05 vs. CV. Teste *t* não pareado.

5- DISCUSSÃO

Neste trabalho mostramos que a dieta HC causou dano morfofuncional no coração. O tratamento com glibenclamida inibiu a ativação da caspase-1 e reverteu todos os danos, sugerindo a participação do inflamassoma NLRP3 nas alterações cardíacas causadas pelo açúcar.

O aumento da massa do VE na ecocardiografia somado ao aumento de peso do coração (tabela 1 e figuras 10 e 14) indicam hipertrofia cardíaca. A hipertrofia ventricular esquerda é um fator de risco cardiovascular independente (Shimizu and Minamino 2016), isso é, sua presença aumenta a chance de morbidade e mortalidade por DCV. Esta relação entre aumento do peso do VE com risco cardiovascular é descrita há muito tempo (Kannel, Levy et al. 1987).

A hipertrofia cardíaca associada à diminuição da câmara ventricular esquerda e ao aumento da espessura das paredes (ao ecocardiograma e morfometria), tanto septal como ventricular esquerda, indicam remodelamento do tipo concêntrico patológico (Mill and Vassallo 2001). O remodelamento cardíaco é considerado fisiológico quando associada à função cardíaca normal e ocorre durante a gravidez, em resposta ao exercício físico ou durante o crescimento natural do indivíduo (Shimizu and Minamino 2016). A hipertrofia patológica é acompanhada de morte de cardiomiócitos, remodelamento fibrótico e é caracterizada por uma disfunção sistólica e diastólica que, em geral, progride para insuficiência cardíaca (IC) (Shimizu and Minamino 2016). A hipertrofia cardíaca também pode ser classificada de acordo com a forma geométrica do coração. Uma hipertrofia excêntrica, de forma não patológica, apresenta aumento no volume ventricular com um crescimento coordenado da espessura da parede e septo. Nessa condição os cardiomiócitos crescem em série e em paralelo (Shimizu and Minamino 2016). Na hipertrofia excêntrica patológica ocorre dilatação ventricular com crescimento de cardiomiócitos preferencialmente em série, e se desenvolve em casos de infarto do miocárdio e em cardiomiopatias dilatadas. Na hipertrofia concêntrica há aumento da massa ventricular, aumento da espessura da parede e redução dos diâmetros cavitários. Os cardiomiócitos crescem mais em paralelo do que em série, e esse tipo de hipertrofia se desenvolve geralmente sob condições patológicas como hipertensão e doenças valvulares e é a forma de remodelamento mais associada à IC (Geraldo and Vassallo 2001, Shimizu and Minamino 2016). De todos os padrões geométricos cardíacos, o remodelamento hipertrófico concêntrico é aquele associado à maior incidência de eventos cardiovasculares, como morte, reinfarto, IC e acidente vascular encefálico (Konstam, Kramer et al. 2011)

O açúcar poderia causar hipertrofia e remodelamento cardíacos por diferentes mecanismos: indiretamente causando diabetes e obesidade, que geram formas cardiomiopatias indiretamente, por meio de alterações hemodinâmicas, das quais a elevação da pressão arterial é a mais importante (Hwang, Ho et al. 1987, G. Preuss, Zein et al. 1998); diretamente, ativando vias hipertróficas no coração (Luo, Huang et al. 2017).

Embora se reconheça o papel do açúcar na gênese da hipertensão arterial (Hwang, Ho et al. 1987), a dieta HC não causou alteração da pressão arterial pelas formas de avaliação usadas [indireta (figuras 9 e 13) e direta sob anestesia (figura 16)], mostrando que a pressão arterial não contribuiu para as alterações cardíacas descritas.

A cardiomiopatia diabética, por exemplo, é caracterizada por mudanças estruturais no miocárdio, com na ausência de hipertensão, doença arterial coronariana ou complicações valvulares (Rubler, Dlugash et al. 1972, Huynh, Bernardo et al. 2014). No presente estudo, não foi encontrada hiperglicemia em jejum nem com quatro nem com oito semanas de dieta HC, os animais não ficaram intolerantes à glicose e os resultados dos testes de resistência à insulina não foram consistentes entre um protocolo e outro, com os animais dos grupos experimentais se mostrando ora resistentes, ora não resistentes (figuras 7, 8 e 12). Logo, os animais deste estudo não apresentaram as alterações clássicas observadas nos modelos experimentais de diabetes. A glibenclamida, mesmo sendo um secretagogo de insulina, não interferiu nos parâmetros de homeostasia da glicose (figuras 7 e 12), confirmando que nestas doses, suas ações não são justificadas por seu efeito hipoglicemiante. Portanto, no presente estudo a relação entre dieta HC e prejuízo cardíaco parece não se relacionar ao diabetes.

Apesar de a obesidade também estar associada ao desenvolvimento de cardiomiopatia (Alpert, Lavie et al. 2014), o aumento da gordura visceral não foi a causa dos danos cardíacos encontrados aqui, afinal, no grupo HCG os danos cardíacos foram revertidos sem alteração da obesidade visceral (figuras 6 e 11). Logo, a associação entre dieta HC com a disfunção cardíaca não parece envolver a maior adiposidade ou obesidade.

Nossos dados sugerem uma via hipertrófica cardíaca, induzida por dieta HC, envolvendo a ativação local do inflamassoma NLRP3, conforme os resultados moleculares que mostraram aumento na expressão de NLRP3 e da forma madura da IL-1 β (figura 5). Além disso, o tratamento com glibenclamida reverteu a hipertrofia e a disfunção cardíaca (figuras 14, 15 e 17) e foi associado à menor atividade de caspase-1 nas paredes do VE e septo (figuras 18 e 19), indicando o envolvimento da inibição do inflamassoma NLRP3 como mecanismo de ação da glibenclamida sobre o benefício cardíaco.

Alguns estudos mostraram a participação do inflamassoma NLRP3 no remodelamento cardíaco. Luo, Li et al. 2014 encontraram aumento na expressão de NLRP3, de ASC, caspase-

1 e IL-1 β e hipertrofia excêntrica num modelo animal de diabetes tipo 2 induzido por dieta rica em gordura (HF: *high fat diet*) e baixa dose de estreptozotocina. Esta hipertrofia foi revertida quando o gene NLRP3 foi silenciado (Luo, Li et al. 2014). Em modelo animal de infarto agudo do miocárdio, causado por ligação permanente da artéria coronária esquerda, houve hipertrofia excêntrica e o silenciamento do NLRP3 reverteu o remodelamento cardíaco (Mezzaroma, Toldo et al. 2011). Do nosso conhecimento, este trabalho é a primeira demonstração da implicação do inflamassoma NLRP3 no remodelamento hipertrófico concêntrico.

A glibenclamida é sulfoniluréia muito usada nos Estados Unidos no tratamento do diabetes tipo 2. Seu mecanismo tradicional é o bloqueio de canais para potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}) (Ashcroft 2005). Os canais K_{ATP} são chamados assim devido a sensibilidade ao ATP intracelular. Nas células β pancreáticas esses canais regulam a secreção de insulina dependente de glicose e servem também como alvo de sulfoniluréis (Ashcroft 2005). Sob concentrações subestimulatórias de glicose, o efluxo de K^+ através dos canais K_{ATP} abertos mantém a membrana das células β num potencial negativo, no qual mantém os canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem fechados. O aumento na glicose plasmática estimula a captação de glicose e aumenta o metabolismo na célula β pancreática produzindo aumento da concentração de ATP. O aumento de ATP é um estímulo para o fechamento dos canais K_{ATP} , induzindo a despolarização da membrana que abre os canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem. Inicia-se então uma atividade elétrica na célula, com influxo de Ca^{2+} , aumentando a concentração de cálcio intracelular, que por fim estimula a exocitose dos grânulos de insulina (Ashcroft 2005). Este mecanismo explica porque sulfoniluréis como tolbutamida e glibenclamida são efetivas na secreção de insulina e usadas no tratamento do diabetes tipo 2.

Além de ser usada no tratamento de diabetes tipo 2, inclusive em neonatos (Beltrand, Baptiste et al. 2019) e gestantes (Malek and Davis 2016), outros estudos com glibenclamida mostram que ela protege o sistema nervoso central após dano cerebral, diminuindo apoptose e prevenindo rompimento da barreira hematoencefálica (Xu, Yuan et al. 2017), atua na prevenção e tratamento de edema cerebral (Tsarenko, Dzyadz'ko et al. 2017), atenua o desenvolvimento de disfunção no miocárdio em camundongos tratados com LPS e reduz a mortalidade por disfunção cardíaca na sepse (Zhang, Xu et al. 2014) e inibe a lesão cardíaca em sepse aguda (Cai, Lu et al. 2014), sendo essas melhoras ocorridas nesses dois últimos estudos por meio da inibição de inflamassoma NLRP3. Portanto, por auxiliar no tratamento de lesões em órgãos-alvo, já ser uma droga aprovada para uso em humanos, ter estudos comprovando sua eficácia como inibidor seletivo de inflamassoma NLRP3 (Lamkanfi,

Mueller et al. 2009), além de ser acessível e de baixo custo, a glibenclamida foi o fármaco de escolha para este estudo.

Testes com doses crescentes administradas por via oral foram feitos e verificou-se que com 5mg/kg diários num tratamento de 14 dias consecutivos a glibenclamida reverteu danos no miocárdio diminuindo a vacuolização e inchaço mitocondrial, bem como a desintegração de miofibrilas. A glibenclamida também diminuiu o número de células apoptóticas e a infiltração de macrófagos nos cardiomiócitos, diminuiu a expressão de NLRP3, caspase-1 e IL-1 β induzida por hiperglicemia e LPS *in vitro* (Cai, Lu et al. 2014).

O mecanismo pelo qual a glibenclamida age inibindo o inflamassoma NLRP3 melhorando ou prevenindo esses danos cardíacos ainda não está totalmente elucidado. Lamkanfi, Mueller et al. 2009 mostraram que essa inibição é independente de canais K_{ATP} . Esses canais K_{ATP} são complexos octaméricos que possuem quatro unidades Kir6.x e quatro receptores de sulfolinuréias SUR, que pertencem à família de transportadores ligados ao ATP (ABC: *ATP-binding cassette*) (Lamkanfi, Mueller et al. 2009). Um dos estímulos para ativação de inflamassoma NLRP3 é o efluxo de K^+ , que ocorre quando a concentração de ATP aumenta e ativa o receptor purinérgico P2X₇ (Meylan, Tschopp et al. 2006). Entretanto, macrófagos de camundongos *knockout* para Kir6.1, Kir6.2 e P2X₇ apresentaram ativação de inflamassoma NLRP3 induzida por LPS e inibição do mesmo quando incubadas com glibenclamida (Lamkanfi, Mueller et al. 2009). O transportador ABC do tipo ABCA1 também é um alvo de inibição por glibenclamida. Entretanto, a glibenclamida inibiu a ativação de caspase-1 em células de animais *knockout* para ABCA1 (Lamkanfi, Mueller et al. 2009). Portanto, os alvos conhecidos da glibenclamida são dispensáveis para seu efeito de inibição da ativação do inflamassoma NLRP3. Segundo Lamkanfi, Mueller et al. 2009, a glibenclamida tem seu sítio de ação à jusante à P2X₇ e à montante ao inflamassoma NLRP3. Além disso, a inibição de caspase-1 por o glibenclamida é seletiva à inibição de inflamassoma NLRP3, já que outros membros da família de inflamassomas como NLRC4 e NLRP-1 não tiveram sua habilidade de ativação de IL-1 β inibida (Lamkanfi, Mueller et al. 2009).

A disfunção cardíaca induzida pela dieta HC também foi revertida pela glibenclamida. O índice de contratilidade mais comumente utilizado é a derivada de pressão ventricular esquerda pela derivada do tempo a (dP/dt). Este parâmetro considera tanto a pressão desenvolvida pelo ventrículo como o tempo de duração das fases de contração e relaxamento. Assim, a dP/dt_{máx} é o maior valor de dP/dt que ocorre durante a porção do ciclo cardíaco em que a pressão está aumentando na sístole ventricular. Ao contrário, a dP/dt_{mín} é o valor mínimo de um pico negativo de dP/dt que ocorre durante a porção do ciclo cardíaco em que a pressão está diminuindo na diástole ventricular (Sarazan, Kroehle et al. 2012). Uma queda nos

valores de dP/dt representa queda na contratilidade cardíaca, a qual pode exacerbar os sintomas e as conseqüências de uma insuficiência cardíaca (Sarazan, Kroehle et al. 2012). A reversão da disfunção promovida pela glibenclamida, pode ter sido devido à menor atividade de caspase-1 ativa no tecido cardíaco, com conseqüente diminuição de IL-1 β ativa.

Os cardiomiócitos possuem todos os componentes de formação do complexo protéico do inflamassoma NLRP3 e nestas células a ativação de caspase-1 e induz a morte celular dependente de caspase-1, conhecida como piroptose (Mezzaroma, Toldo et al. 2011). A piroptose é associada à fragmentação de DNA e à perda de integridade da membrana (Mezzaroma, Toldo et al. 2011). A piroptose se caracteriza por ser dependente de caspase-1 e ser conseqüente à indução de processo pró-inflamatório por meio de citocinas. É diferente da apoptose, que é um processo fisiológico controlado, no qual ocorre uma condensação nuclear e citoplasmática e fragmentação celular, sendo os fragmentos gerados degradados por fagossomos, sem ruptura de membrana. A piroptose de cardiomiócitos é seguida de remodelamento cardíaco e finalmente insuficiência cardíaca (Merkle, Frantz et al. 2007).

Com mais caspase-1 ativa no miocárdio, mais IL-1 β ativa atua no tecido. O miocárdio é altamente sensível à citocina IL-1 β , que deprime a função miocárdica por meio da diminuição da força contrátil nas trabéculas cárneas (Pomerantz, Reznikov et al. 2001). A IL-1 β também diminui a resposta β -adrenérgica em canais de cálcio do tipo L num mecanismo dependente de cAMP (Liu, Zhou et al. 1999); diminui a expressão de genes importantes na regulação da homeostase do cálcio (Combes, Frye et al. 2002); aumenta a expressão de sintase do óxido nítrico em cardiomiócitos, causando aumento dos níveis do óxido nítrico, o qual compromete a atividade mitocondrial e, assim, diminui a produção de energia para a contratilidade miocárdica (Tatsumi, Matoba et al. 2000). O antagonista endógeno de IL-1 β , que é o receptor solúvel de IL-1 (IL-1Ra), assim como o antagonista exógeno, anankira, possuem efeito cardioprotetor por meio da diminuição da morte celular, controlando assim o remodelamento cardíaco e evitando a dilatação cardíaca em modelo experimental de infarto agudo do miocárdio (Abbate, Salloum et al. 2008). Assim, é possível que o benefício do tratamento com glibenclamida sobre a disfunção cardíaca induzida por dieta HC envolvam a redução da IL-1 β . Uma limitação do nosso trabalho está na ausência da demonstração do efeito do tratamento com glibenclamida sobre os níveis cardíaco de IL-1 β .

Vários são os estímulos que ativam o inflamassoma NLRP3, como toxinas bacterianas que formam poros, luz ultravioleta, ATP, glicose, peptídeo β -amilóide, disfunção mitocondrial e outros estímulos ambientais. Esses estímulos podem induzir três vias de sinalização distintas: uma em que o NLRP3 é ativado pelo efluxo de potássio e a perda da integridade da membrana; a segunda, em que partículas desestabilizam o lisossoma, liberando

ligantes diretos do NLRP3; e por último, DAMPs ou PAMPs induzem ERO que ativam direta ou indiretamente o inflamassoma NLRP3 (Luo, Huang et al. 2017). Para tanto, um primeiro sinal promove a expressão de NLRP3 e das citocinas imaturas, seguido de modulação estrutural, que induz a formação do complexo inflamassoma (sinal 2).

Cristais de açúcar ativam diretamente o inflamassoma NLRP3 em células β pancreáticas por um mecanismo dependente de ERO, o que está implicado no desenvolvimento do diabetes (Davis and Ting 2010). É improvável que este seja o mesmo mecanismo pelo qual a dieta HC ative a caspase-1 no miocárdio, uma vez que os animais não apresentam hiperglicemia em jejum. Uma sugestão é que o consumo da ração rica em açúcar refinado altere o metabolismo de glicose pelo miocárdio, levando ao estresse oxidativo local (Porto, Savergnini et al. 2011). As ERO ativariam o inflamassoma NLRP3, levando ao remodelamento e disfunção cardíaca (figura 21).

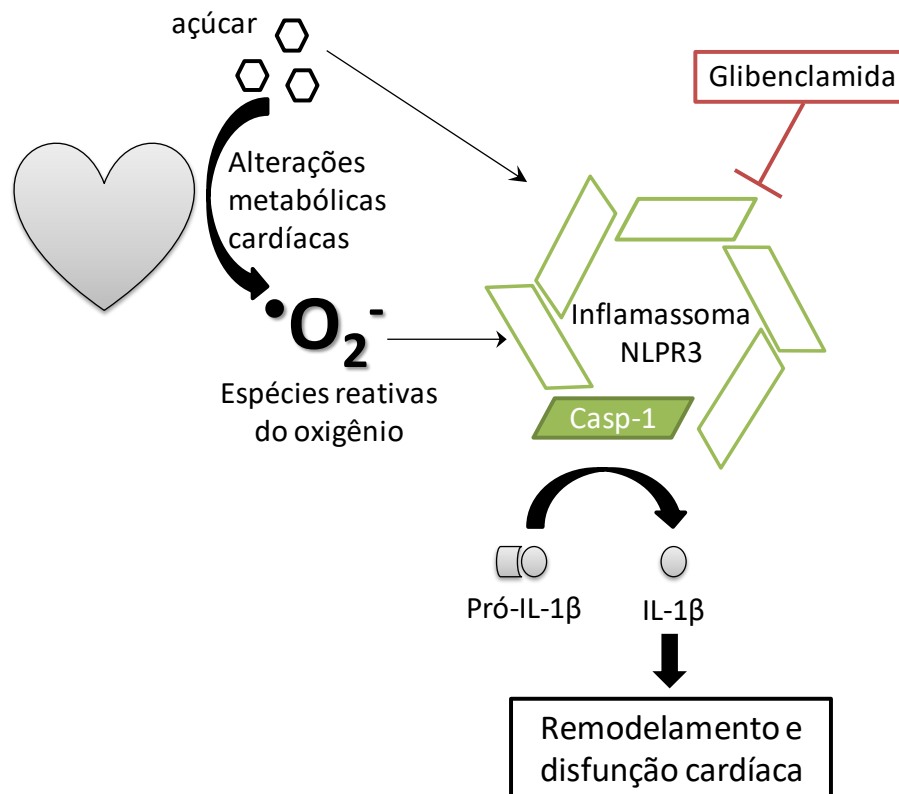


Figura 21: Modelo proposto da ativação cardíaca do inflamassoma NLRP3 induzida por dieta rica em açúcar. O excesso de açúcar poderia ativar o complexo inflamassoma NLRP3 diretamente, por deposição de cristais de glicose, ou indiretamente, via produção de espécies reativas do oxigênio oriundas da utilização de glicose e ácidos graxos pelo miocárdio. Uma vez ativado, o inflamassoma NLRP3, via caspase-1, ativa a citocina IL-1 β , a qual contribui para o remodelamento e disfunção cardíaca.

Ainda existem poucos estudos procurando elucidar a contribuição isolada de açúcares refinados sobre os danos cardíacos. Neste estudo, mostramos que a inibição do inflamassoma

NLPR3 com glibenclamida reverte as alterações cardíacas induzidas por dieta HC, sem influência sobre a pressão arterial, homeostasia da glicose e adiposidade visceral. Assim, nossos dados se somam a outros da literatura que apontam o inflamassoma NLPR3 como alvo para tratar ou prevenir as disfunções que levam à insuficiência cardíaca. Como a glibenclamida já é amplamente utilizada por diabéticos, ela poderia ter efeito adicional cardioprotetor. Contudo, os estudos clínicos não dão suporte à esta ideia, uma vez que a glibenclamida não previne os desfechos cardíacos comparada a outros antidiabéticos (Pantalone, Kattan et al. 2012, Leonard, Brensinger et al. 2018). Assim, inibidores seletivos são requeridos para a translação dos nossos achados para o tratamento do remodelamento e da disfunção cardíaca.

6- CONCLUSÃO

O consumo de uma dieta rica em carboidratos refinados causa danos ao coração por meio da ativação do inflamassoma NLRP3, com conseqüente aumento de caspase-1, a enzima responsável pela inflamação e disfunção no miocárdio. A glibenclamida, uma droga muito utilizada no controle do diabetes tipo 2, reverte o remodelamento e a disfunção cardíaca provocados pela dieta HC, se mostrando uma droga promissora para evitar o desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Entretanto, as implicações do uso da glibenclamida para esta finalidade ainda necessitam de mais elucidação.

REFERÊNCIAS

- Abbate, A., F. N. Salloum, E. Vecile, A. Das, N. N. Hoke, S. Straino, G. G. Biondi-Zoccai, J. E. Houser, I. Z. Qureshi, E. D. Ownby, E. Gustini, L. M. Biasucci, A. Severino, M. C. Capogrossi, G. W. Vetovec, F. Crea, A. Baldi, R. C. Kukreja and A. Dobrina (2008). "Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction." Circulation **117**(20): 2670-2683.
- Ashcroft, F. M. (2005). "ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion." J Clin Invest **115**(8): 2047-2058.
- Axelsen, L. N., J. B. Lademann, J. S. Petersen, N. H. Holstein-Rathlou, T. Ploug, C. Prats, H. D. Pedersen and A. L. Kjolbye (2010). "Cardiac and metabolic changes in long-term high fructose-fat fed rats with severe obesity and extensive intramyocardial lipid accumulation." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **298**(6): R1560-1570.
- Beltrand, J., A. Baptiste, K. Busiah, N. Bouazza, C. Godot, A. Boucheron, Z. Djerada, C. Gozalo, M. Berdugo, J. M. Treluyer, C. Elie and M. Polak (2019). "Glibenclamide oral suspension: Suitable and effective in patients with neonatal diabetes." Pediatr Diabetes.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**(1): 248-254.
- Cai, J., S. Lu, Z. Yao, Y. P. Deng, L. D. Zhang, J. W. Yu, G. F. Ren, F. M. Shen and G. J. Jiang (2014). "Glibenclamide attenuates myocardial injury by lipopolysaccharides in streptozotocin-induced diabetic mice." Cardiovasc Diabetol **13**: 106.
- Cau, S. B., D. A. Guimaraes, E. Rizzi, C. S. Ceron, R. F. Gerlach and J. E. Tanus-Santos (2015). "The Nuclear Factor kappaB Inhibitor Pyrrolidine Dithiocarbamate Prevents Cardiac Remodelling and Matrix Metalloproteinase-2 Up-Regulation in Renovascular Hypertension." Basic Clin Pharmacol Toxicol **117**(4): 234-241.
- Combes, A., C. S. Frye, B. H. Lemster, S. S. Brooks, S. C. Watkins, A. M. Feldman and C. F. McTiernan (2002). "Chronic exposure to interleukin 1beta induces a delayed and reversible alteration in excitation-contraction coupling of cultured cardiomyocytes." Pflugers Arch **445**(2): 246-256.
- Davis, B. K. and J. P.-Y. Ting (2010). "NLRP3 has a sweet tooth." Nature Immunology **11**: 105.
- Dhingra, R., L. Sullivan, P. F. Jacques, T. J. Wang, C. S. Fox, J. B. Meigs, R. B. D'Agostino, J. M. Gaziano and R. S. Vasan (2007). "Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community." Circulation **116**(5): 480-488.
- DiNicolantonio, J. J. and S. C. Lucan (2014). "The wrong white crystals: not salt but sugar as aetiological in hypertension and cardiometabolic disease." Open Heart **1**(1): e000167.
- Duewell, P., H. Kono, K. J. Rayner, C. M. Sirois, G. Vladimer, F. G. Bauernfeind, G. S. Abela, L. Franchi, G. Nuñez, M. Schnurr, T. Espevik, E. Lien, K. A. Fitzgerald, K. L. Rock, K. J. Moore, S. D. Wright, V. Hornung and E. Latz (2010). "NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals." Nature **464**: 1357.

- Dutta, K., D. A. Podolin, M. B. Davidson and A. J. Davidoff (2001). "Cardiomyocyte dysfunction in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance." Diabetes **50**(5): 1186-1192.
- Fung, T. T., V. Malik, K. M. Rexrode, J. E. Manson, W. C. Willett and F. B. Hu (2009). "Sweetened beverage consumption and risk of coronary heart disease in women." Am J Clin Nutr **89**(4): 1037-1042.
- G. Preuss, H., M. Zein, P. MacArthy, D. Dipette, S. Sabnis and J. Knapka (1998). Sugar-Induced Blood Pressure Elevations Over the Lifespan of Three Substrains of Wistar Rats.
- Gao, S., D. Ho, D. E. Vatner and S. F. Vatner (2011). "Echocardiography in Mice." Current protocols in mouse biology **1**: 71-83.
- Hotamisligil, G. S. (2006). "Inflammation and metabolic disorders." Nature **444**: 860.
- Huynh, K., B. C. Bernardo, J. R. McMullen and R. H. Ritchie (2014). "Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways." Pharmacol Ther **142**(3): 375-415.
- Hwang, I. S., H. Ho, B. B. Hoffman and G. M. Reaven (1987). "Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats." Hypertension **10**(5): 512-516.
- Jo, E.-K., J. K. Kim, D.-M. Shin and C. Sasakawa (2016). "Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation." Cellular & molecular immunology **13**(2): 148-159.
- Kannel, W. B., D. Levy and L. A. Cupples (1987). "Left ventricular hypertrophy and risk of cardiac failure: insights from the Framingham Study." J Cardiovasc Pharmacol **10 Suppl 6**: S135-140.
- Kawaguchi, M., M. Takahashi, T. Hata, Y. Kashima, F. Usui, H. Morimoto, A. Izawa, Y. Takahashi, J. Masumoto, J. Koyama, M. Hongo, T. Noda, J. Nakayama, J. Sagara, S. Taniguchi and U. Ikeda (2011). "Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury." Circulation **123**(6): 594-604.
- Kawahara, Y., K. Tanonaka, T. Daicho, M. Nawa, R. Oikawa, Y. Nasa and S. Takeo (2005). "Preferable anesthetic conditions for echocardiographic determination of murine cardiac function." J Pharmacol Sci **99**(1): 95-104.
- Kobayashi, M., F. Usui-Kawanishi, T. Karasawa, H. Kimura, S. Watanabe, N. Mise, F. Kayama, T. Kasahara, N. Hasebe and M. Takahashi (2017). "The cardiac glycoside ouabain activates NLRP3 inflammasomes and promotes cardiac inflammation and dysfunction." **12**(5): e0176676.
- Konstam, M. A., D. G. Kramer, A. R. Patel, M. S. Maron and J. E. Udelson (2011). "Left Ventricular Remodeling in Heart Failure: Current Concepts in Clinical Significance and Assessment." JACC: Cardiovascular Imaging **4**(1): 98-108.
- Lamkanfi, M., J. L. Mueller, A. C. Vitari, S. Misaghi, A. Fedorova, K. Deshayes, W. P. Lee, H. M. Hoffman and V. M. Dixit (2009). "Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome." J Cell Biol **187**(1): 61-70.
- Leonard, C. E., C. M. Brensinger, C. L. Aquilante, W. B. Bilker, D. M. Boudreau, R. Deo, J. H. Flory, J. J. Gagne, M. J. Mangaali and S. Hennessy (2018). "Comparative Safety of

Sulfonylureas and the Risk of Sudden Cardiac Arrest and Ventricular Arrhythmia." Diabetes Care **41**(4): 713-722.

Li, Y., A. Hruby, A. M. Bernstein, S. H. Ley, D. D. Wang, S. E. Chiuve, L. Sampson, K. M. Rexrode, E. B. Rimm, W. C. Willett and F. B. Hu (2015). "Saturated Fats Compared With Unsaturated Fats and Sources of Carbohydrates in Relation to Risk of Coronary Heart Disease: A Prospective Cohort Study." Journal of the American College of Cardiology **66**(14): 1538-1548.

Liu, S. J., W. Zhou and R. H. Kennedy (1999). "Suppression of beta-adrenergic responsiveness of L-type Ca²⁺ current by IL-1beta in rat ventricular myocytes." Am J Physiol **276**(1): H141-148.

Luo, B., F. Huang, Y. Liu, Y. Liang, Z. Wei, H. Ke, Z. Zeng, W. Huang and Y. He (2017). "NLRP3 Inflammasome as a Molecular Marker in Diabetic Cardiomyopathy." Front Physiol **8**: 519.

Luo, B., B. Li, W. Wang, X. Liu, Y. Xia, C. Zhang, M. Zhang, Y. Zhang and F. An (2014). "NLRP3 gene silencing ameliorates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetes rat model." PLoS One **9**(8): e104771.

Magalhaes, J. G., M. T. Sorbara, S. E. Girardin and D. J. Philpott (2011). "What is new with Nods?" Current Opinion in Immunology **23**(1): 29-34.

Malek, R. and S. N. Davis (2016). "Pharmacokinetics, efficacy and safety of glyburide for treatment of gestational diabetes mellitus." Expert Opin Drug Metab Toxicol **12**(6): 691-699.

Martinon, F. (2010). "Signaling by ROS drives inflammasome activation." Eur J Immunol **40**(3): 616-619.

Martinon, F., V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel and J. Tschopp (2006). "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." Nature **440**(7081): 237-241.

Mellor, K. M., J. R. Bell, M. J. Young, R. H. Ritchie and L. M. Delbridge (2011). "Myocardial autophagy activation and suppressed survival signaling is associated with insulin resistance in fructose-fed mice." J Mol Cell Cardiol **50**(6): 1035-1043.

Merkle, S., S. Frantz, M. P. Schon, J. Bauersachs, M. Buitrago, R. J. Frost, E. M. Schmitteckert, M. J. Lohse and S. Engelhardt (2007). "A role for caspase-1 in heart failure." Circ Res **100**(5): 645-653.

Meylan, E., J. Tschopp and M. Karin (2006). "Intracellular pattern recognition receptors in the host response." Nature **442**(7098): 39-44.

Mezzaroma, E., S. Toldo, D. Farkas, I. M. Seropian, B. W. Van Tassell, F. N. Salloum, H. R. Kannan, A. C. Menna, N. F. Voelkel and A. Abbate (2011). "The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(49): 19725-19730.

Mill, J. G. and D. V. Vassallo (2001). "Hipertrofia cardíaca." Rev Bras Hipertens **8**(1): 18-29.

Oliveira, M. C., Z. Menezes-Garcia, M. C. Henriques, F. M. Soriani, V. Pinho, A. M. Faria, A. F. Santiago, D. C. Cara, D. G. Souza, M. M. Teixeira and A. V. Ferreira (2013). "Acute

and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice." Obesity (Silver Spring) **21**(9): E396-406.

Pacher, P., T. Nagayama, P. Mukhopadhyay, S. Batkai and D. A. Kass (2008). "Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats." Nature protocols **3**(9): 1422-1434.

Pantalone, K. M., M. W. Kattan, C. Yu, B. J. Wells, S. Arrigain, A. Jain, A. Atreja and R. S. Zimmerman (2012). "Increase in overall mortality risk in patients with type 2 diabetes receiving glipizide, glyburide or glimepiride monotherapy versus metformin: a retrospective analysis." Diabetes Obes Metab **14**(9): 803-809.

Pellikka, P. A., S. F. Nagueh, A. A. Elhendy, C. A. Kuehl and S. G. Sawada (2007). "American Society of Echocardiography Recommendations for Performance, Interpretation, and Application of Stress Echocardiography." Journal of the American Society of Echocardiography **20**(9): 1021-1041.

Pereira, R. A., K. J. Duffey, R. Sichieri and B. M. Popkin (2012). "Sources of excessive saturated fat, trans fat and sugar consumption in Brazil: an analysis of the first Brazilian nationwide individual dietary survey." Public Health Nutrition **17**(1): 113-121.

Pomerantz, B. J., L. L. Reznikov, A. H. Harken and C. A. Dinarello (2001). "Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1beta." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(5): 2871-2876.

Porto, L. C., S. S. Savergnini, C. H. de Castro, E. G. Mario, A. V. Ferreira, S. H. Santos, S. P. Andrade, R. A. Santos, A. P. de Almeida and L. M. Botion (2011). "Carbohydrate-enriched diet impairs cardiac performance by decreasing the utilization of fatty acid and glucose." Ther Adv Cardiovasc Dis **5**(1): 11-22.

Riddle, M. C. (2003). "Sulfonylureas Differ in Effects on Ischemic Preconditioning—Is it Time to Retire Glyburide?" The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **88**(2): 528-530.

Sarazan, R. D., J. P. Kroehle and B. W. Main (2012). "Left ventricular pressure, contractility and dP/dt(max) in nonclinical drug safety assessment studies." J Pharmacol Toxicol Methods **66**(2): 71-78.

Sharma, A., M. Tate, G. Mathew, J. E. Vince, R. H. Ritchie and J. B. de Haan (2018). "Oxidative Stress and NLRP3-Inflammasome Activity as Significant Drivers of Diabetic Cardiovascular Complications: Therapeutic Implications." Front Physiol **9**: 114.

Shen, H.-H., Y.-X. Yang, X. Meng, X.-Y. Luo, X.-M. Li, Z.-W. Shuai, D.-Q. Ye and H.-F. Pan (2018). "NLRP3: A promising therapeutic target for autoimmune diseases." Autoimmunity Reviews **17**(7): 694-702.

Shi, H., Z. Zhang, X. Wang, R. Li, W. Hou, W. Bi and X. Zhang (2015). "Inhibition of autophagy induces IL-1beta release from ARPE-19 cells via ROS mediated NLRP3 inflammasome activation under high glucose stress." Biochem Biophys Res Commun **463**(4): 1071-1076.

- Shimizu, I. and T. Minamino (2016). "Physiological and pathological cardiac hypertrophy." J Mol Cell Cardiol **97**: 245-262.
- Tatsumi, T., S. Matoba, A. Kawahara, N. Keira, J. Shiraishi, K. Akashi, M. Kobara, T. Tanaka, M. Katamura, C. Nakagawa, B. Ohta, T. Shirayama, K. Takeda, J. Asayama, H. Fliss and M. Nakagawa (2000). "Cytokine-induced nitric oxide production inhibits mitochondrial energy production and impairs contractile function in rat cardiac myocytes." J Am Coll Cardiol **35**(5): 1338-1346.
- Temple, N. J. (2018). "Fat, Sugar, Whole Grains and Heart Disease: 50 Years of Confusion." Nutrients **10**(1): 39.
- Tsarenko, S. V., A. M. Dzyadz'ko and S. S. Rybalko (2017). "[Glibenclamide as a promising agent for prevention and treatment of cerebral edema]." Zh Vopr Neurokhir Im N N Burdenko **81**(3): 88-93.
- Tschopp, J., F. Martinon and K. Burns (2003). "NALPs: a novel protein family involved in inflammation." Nature Reviews Molecular Cell Biology **4**: 95.
- Vartanian, L. R., M. B. Schwartz and K. D. Brownell (2007). "Effects of Soft Drink Consumption on Nutrition and Health: A Systematic Review and Meta-Analysis." American Journal of Public Health **97**(4): 667-675.
- WHO. (2015). " World Health Organization. Guideline: Sugars intake for adults and children.", from https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/149782/9789241549028_eng.pdf?sequence=1.
- WHO. (2016). " World Health Organization. Global report on diabetes.", from https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257_eng.pdf;jsessionid=B2F65CD7A15D31DA8618C90187B0DBC0?sequence=1.
- Worldatlas. (2017). "Top Sugar Consuming Nations In The World." from <https://www.worldatlas.com/articles/top-sugar-consuming-nations-in-the-world.html>.
- Xu, Z. M., F. Yuan, Y. L. Liu, J. Ding and H. L. Tian (2017). "Glibenclamide Attenuates Blood-Brain Barrier Disruption in Adult Mice after Traumatic Brain Injury." J Neurotrauma **34**(4): 925-933.
- Yang, Y., H. Wang, M. Kouadir, H. Song and F. Shi (2019). "Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors." Cell death & disease **10**(2): 128-128.
- Zhang, B., J. P. Davis and M. T. Ziolo (2015). "Cardiac Catheterization in Mice to Measure the Pressure Volume Relationship: Investigating the Bowditch Effect." J Vis Exp(100): e52618.
- Zhang, W., X. Xu, R. Kao, T. Mele, P. Kvietys, C. M. Martin and T. Rui (2014). "Cardiac fibroblasts contribute to myocardial dysfunction in mice with sepsis: the role of NLRP3 inflammasome activation." PLoS One **9**(9): e107639.