

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



EUNICE CRISTINA DA SILVA COSTA

GLICOGÊNIO CARDÍACO EM DIABETES EXPERIMENTAL

**Efeitos do tratamento com metformina e/ou glibenclamida sobre
as funções cardíacas em coração isolado.**

Este exemplar corresponde à redação
da tese defendida pelo(a) candidato
Eunice Cristina da Silva Costa
[assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora:
[assinatura]

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Doutor em
Biologia Funcional e Molecular
na área de Fisiologia.

[assinatura]
Orientador: Prof. Dr. Antonio Ari Gonçalves

Campinas

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C823g

Costa, Eunice Cristina da Silva

Glicogênio cardíaco em diabetes experimental: efeitos do tratamento com metformina a/ou glibenclamida sobre as funções cardíacas em coração isolado / Eunice Cristina da Silva Costa. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Antonio Ari Gonçalves.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Diabetes. 2. Coração. 3. Metabolismo. 4. Metformina. 5. Glibenclamida. I. Antonio Ari Gonçalves. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdet/ib)

Título em inglês: Cardiac glycogen in experimental diabetes: effects of the treatment with metformin and/or glibenclamide on cardiac function of isolated heart.

Palavras-chave em inglês: diabetes, heart, metabolism, metformin, glibenclamide.

Área de concentração: Fisiologia Cardiovascular.

Titulação: Doutorado.

Banca examinadora: Antonio Ari Gonçalves, Carlos Alberto da Silva, Heitor Moreno Júnior, Miguel Arcanjo Áreas, Dora Maria Grassi Kassis.

Data da defesa: 24/06/2005.

Data da Defesa: 24/06/2005

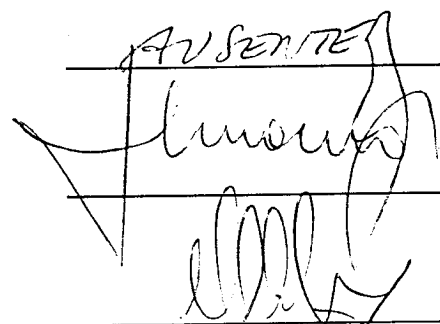
BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Antonio Ari Gonçalves (Orientador)



Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

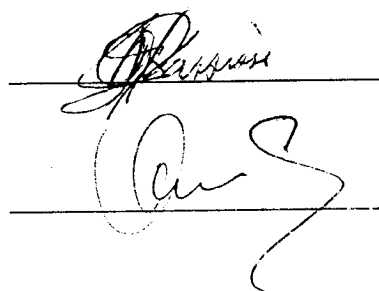
AVSENTE



Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Profª Drª Dora Maria Grassi-Kassisse



Prof. Dr. Armino Antônio Alves

Profª Drª Denise Vaz Macedo



*"para evitar as críticas,
não faça nada,
não diga nada,
não seja nada."*

Elbert Hubbard

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu marido Sérgio,

*“ Quero agradecer-te por tudo,
Pelos momentos em que chorei,
você veio carinhosamente me beijou e me fez sorrir.
Pelos momentos em que perdi a paciência,
você veio com palavras amenas e doces e me acalmou.
Pelos momentos em que meu coração estava em pedaços,
você veio cheio de amor e me curou.
Pelos momentos de alegria,
que fez questão de dividir comigo.
Pelos momentos que com muita esperança,
pensou junto comigo no nosso futuro.”*

Aos meus pais, Manuel e Laurinda

*“ Nada mais merecido do que
homenagear pessoas tão
importantes como vocês!
Os responsáveis pela
minha vida e que me preparou
para o futuro.
Vocês fazem a diferença e são os maiores responsáveis
pelo meu sucesso
E, por isso quero agradecer-lhes.
Muito obrigada.”*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Ari Gonçalves, pela sua dedicação e amizade, exercendo uma profunda influência sobre meu desenvolvimento pessoal e profissional, onde sem o encorajamento, estímulo e exemplo não conseguiria realizar esta tese;

Ao Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas, que não poderia ter outro nome, por ser o anjo que sempre me ajudou em todas etapas desta tese, seja pela sua grande amizade, seja pelo excelente professor que é, seja pela capacidade de resolver problemas quando tudo parecia estar perdido e ainda nos fazer sorrir mesmo quando a vontade era de chorar;

Ao Prof. Dr. Marcos Fontana (*in memoriam*) pela sua ajuda fundamental ao nos apresentar (eu e prof. Ari) ao Prof Heitor Moreno do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas, onde realmente iniciou-se a execução dos experimentos desta tese.

Ao Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior que também foi um dos responsáveis pelo bom andamento desta tese, nos cedendo seu laboratório para trabalharmos e assim obtermos ótimos resultados aqui apresentados;

A grande amiga Valéria Frigatto por seu enorme auxílio na execução dos experimentos de Langendorff, que foram dados essenciais para a conclusão desta tese;

Ao Prof Dr. Norair Salviano dos Reis, pela sua ajuda e paciência na análise das lâminas de histologia;

A Prof. Dr^a Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes por ceder seu laboratório para avaliarmos as lâminas de histologia;

A amiga Mércia Tancredo Toledo pelo auxílio na utilização do microscópio e obtenção de imagens e também por seus estímulos constantes;

Ao amigo Rafael Gustavo que me auxiliou nos cuidados básicos aos ratos.

Ao Prof. Mestre Sidnei Ragazzi pelo auxílio na análise estatística dos resultados contidos nesta tese.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva, pelos ensinamentos que foram de grande importância e valor no início de meus estudos;

A todos professores que foram responsáveis pela minha formação acadêmica;

A todos colegas da pós-graduação, em especial a Gislaine Ventrucchi, pela amizade e ajuda no dia-a-dia;

A todos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica pela amizade constante;

Ao programa de bolsas do CNPq, pelo auxílio financeiro proporcionado;

A Lipha, pelo auxílio financeiro dado ao laboratório e pelo fornecimento de metformina;

Aos meus irmãos, Fernando e Paulo, pelos incentivos constantes;

As minhas cunhadas Sônia e Clarice, pela amizade;

A Deus que sempre me deu forças para continuar lutando.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Objetivos: Metformina e glibenclamida são fármacos utilizados para diminuir a glicemia de diabéticos tipo 2. Metformina reduz a absorção gastrintestinal de glicose e a gliconeogênese hepática e aumenta a captação de glicose periférica. Por sua vez, glibenclamida aumenta a liberação de insulina após bloquear canais de K^+ . Apesar destes efeitos, metformina em altas concentrações e glibenclamida podem influenciar o sistema cardiovascular e acelerar a progressão de doenças vasculares, predispondo o coração à falência cardíaca ou infarto. Estas e outras mudanças fisiológicas podem ser associadas a um ECG anormal, mostrando aumento do intervalo QT e de sua dispersão (QTd). Estas mudanças podem ser associadas a um baixo limiar para arritmias ventriculares e provocar morte súbita durante isquemia. Neste estudo avaliamos os efeitos do tratamento com metformina e/ou glibenclamida em ratos diabéticos por aloxana sobre os intervalos do ECG: QT e suas derivadas QTc, QTd, e QTcd. Em outra série experimental avaliamos a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVP) e as suas derivadas (DP/Dt^+ e DP/Dt^-), usando a preparação de Langendorff utilizando coração isolado de ratos diabéticos. A isquemia foi provocada pela perfusão (1 h) com noradrenalina (NE). Além disso, o glicogênio foi medido em coração de ratos antes e após perfusão com noradrenalina. As alterações histológicas no ventrículo também foram estudadas. **Métodos:** Ratos Wistar machos, diabéticos por aloxana, foram tratados com metformina (3,5, 30 e 74 $\mu g \cdot g^{-1}$ de peso corporal – p.c) ou glibenclamida (0,10 $\mu g/g^{-1}$ p.c) e/ou glibenclamida e metformina (0,10 + 3,5 $\mu g \cdot g^{-1}$ p.c), simultaneamente durante 30 dias. O ECG foi registrado no 15º e 30º dia de tratamento. No 30º dia, sob anestesia, o coração foi isolado e perfundido com solução de Krebs-Henseleit em um aparelho de Langendorff. A isquemia foi induzida com noradrenalina 10^{-6} M (2 ml.min⁻¹.g⁻¹) mantida durante 1 h na solução perfusora. O glicogênio tecidual (mg.100.mg⁻¹) foi extraído de fragmentos de ventrículo de ratos em repouso ou após a perfusão. O glicogênio foi medido pelo método do fenol sulfúrico. Em outros grupos de ratos, preparados de modo idêntico, os corações foram removidos sob anestesia e fixados em formoldeído em

tampão PBS. Secções de ventrículo foram preparadas depois de embebidas em parafina e em seguida, os cortes foram fixados em lâminas e corados pelo método hematoxilina eosina (HE). O ensaio do glicogênio ventricular foi feito usando o método ácido de Schiff. Os núcleos foram contados e as suas áreas foram medidas (μm^2). Os grânulos de glicogênio foram detectados pela coloração violeta do citoplasma, usando o método de schiff (PAS positivo) e fotografados.

Resultados: Após 15 e 30 dias, a glicemia, o intervalo QT e as suas derivadas aumentaram nos ratos diabéticos. Após 30 dias, a glicemia diminuiu em ratos diabéticos que foram tratados com doses baixa ou intermediária de metformina ($3,5$ e $30 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.c.), ou com glibenclamida e com a combinação glibenclamida + metformina ($3,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.c.). Entretanto, o grupo tratado com a dose mais alta de metformina ($74 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.c) não teve a sua glicemia diminuída. Por outro lado, nos ratos tratados com doses: baixa ou intermediária de metformina os intervalos do ECG: QTc, QTd e QTcd foram reduzidos, em relação ao grupo diabético tratado com a maior dose de metformina. Estes resultados também produziram melhores efeitos em comparação aos grupos diabéticos tratados com glibenclamida e nos grupos tratados com a associação glibenclamida e metformina. Doses baixas, intermediárias e altas ($3,5$, 30 e $74 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.c.) de metformina aumentou o armazenamento de glicogênio no ventrículo de ratos diabéticos de $0,19 \pm 0,007$ (controle) para $0,38 \pm 0,007 \text{ mg.100 mg}^{-1}$, $0,5 \pm 0,05 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ e $0,7 \pm 0,04 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ ($p < 0,05$), respectivamente. Quanto à pressão sistólica ventricular, houve rápido aumento da pressão logo no início da perfusão com NE no grupo controle, com pico de pressão a $145 \pm 9,7 \text{ mmHg}$), seguido de lenta queda até $99 \pm 3 \text{ mmHg}$. Esta tendência foi observada também nas derivadas DP/Dt^+ e DP/Dt^- . Metformina ($3,5$ e $30 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.c) e glibenclamida isoladamente ou em associação com metformina protegeram o músculo cardíaco durante a isquemia, não diferindo do grupo controle. Contudo, ratos diabéticos não tratados ou tratados com a maior dose de metformina, desenvolveram pressão sistólica máxima inferior a todos os grupos experimentais, revertendo aos níveis basais mais rapidamente que nos demais grupos. As derivadas DP/Dt^+ e DP/Dt^- mostraram curvas semelhantes. Após a isquemia, o glicogênio diminuiu em todos os grupos, sendo $0,09 \pm 0,007$

no grupo controle; $0,1 \pm 0,006$ nos diabéticos e $0,6 \pm 0,005$ nos diabéticos tratados com $74 \mu\text{g.g}^{-1}$ pc de metformina. O tratamento com glibenclamida e/ou metformina diminuiu o estoque de glicogênio de $0,62 \pm 0,05 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ para $0,19 \pm 0,05 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ e de $0,74 \pm 0,03 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ para $0,22 \pm 0,008 \text{ mg.100 mg}^{-1}$, respectivamente. Entretanto, a utilização de glicogênio foi proporcional em todos os grupos. A análise morfológica demonstrou um aumento na quantidade dos núcleos no coração de ratos diabéticos de $21,33 \pm 1,17$ (no grupo controle) para $36,6 \pm 5$ ($p < 0,05$) e redução na média da área dos núcleos, de $0,16 \pm 0,02$ (controle) para $0,08 \pm 0,01$ ($p < 0,05$). No grupo tratado com a menor concentração de metformina (DM 3.5) diminuiu a quantidade de núcleos de $36,6 \pm 5$ (grupo diabético) para $22,8 \pm 2$ ($p < 0,05$), porém aumentou a média da área dos núcleos de $0,08 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ para $0,17 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,05$). Nos grupos tratados com as maiores doses de metformina (30 e $74 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.c.), a quantidade de núcleos aumentou para $34,16 \pm 1,85$ e $47,29 \pm 2,92$, respectivamente), e suas respectivas áreas aumentaram para $0,86 \pm 0,05$ e $0,5 \pm 0,06$, diferindo dos grupos controle e dos diabéticos não tratados. Nos grupos diabéticos tratados com glibenclamida e glibenclamida + metformina, as áreas dos núcleos aumentaram de $0,08 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ para $0,71 \pm 0,09 \mu\text{m}^2$ e $0,67 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$, respectivamente, ($p < 0,001$).

Conclusões: O aumento na dispersão dos intervalos QT com o tratamento pode significar um risco de arritmia que predispõe ratos à morte súbita. Os resultados da pressão obtidos pelo método de Langendorff indicam que a força de contração diminuiu durante o período de isquemia por NE, sugerindo que o coração estava mais rígido. Estes resultados permitem-nos deduzir que as maiores doses de metformina, $74 \mu\text{g.g}^{-1}$ indicados como as máximas para humanos, podem causar sérios prejuízos ao trabalho cardíaco em caso de sobrecarga. Por outro lado, altas doses de metformina, de glibenclamida e a associação entre estas drogas aumentam a quantidade e o tamanho dos núcleos. Conseqüentemente, o ventrículo hipertrofia, em decorrência do aumento da atividade celular, prejudicando de modo importante, a estrutura e a função cardíaca. Portanto, este

aumento de glicogênio está associado à severidade e à duração do diabetes. Assim, o coração torna-se altamente susceptível à isquemia.

ABSTRACT

Objectives: Metformin and glibenclamide are pharmacos used to decrease blood glucose on type 2 diabetics. Metformin decreases gastrointestinal absorption of glucose and gluconeogenesis and increases peripheric glucose uptake. Glibenclamide increases insulin secretion by blocking K^+ channels. Besides these effects, metformin and glibenclamide may influence cardiovascular system, which accelerate the progression of vascular disease, predisposing heart to failure or infarct. These abnormalities associated to physiological changes may generate an abnormal ECG, with an increased QT interval and its correspondent dispersion (QTd). These changes could be associated to a lower threshold for malignant ventricular arrhythmias and a sudden death by ischemia. The aim of this study was to evaluate the effects of metformin and/or glibenclamide treatment on QT intervals and its derivatives: QTc, QTd, and QTcd. We also evaluated the pressure developed by left ventricle (LVP) and calculate the correspondents derivatives (DP/Dt^+ and DP/Dt^-) on heart isolated from diabetic rats, under ischemia caused by norepinephrine (NE). Glycogen was measured after ischemia and compared to control heart, non-submitted to NE. We also analyzed the histological changes in ventricle cells. **Methods:** Male Wistar diabetic rats were treated by metformin (3.5, 30 and 74 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ b.w) or glibenclamide (0.13 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ b.w) and its association to metformin (0.13 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ b.w + 3.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ b.w) during 30 days. A 6-lead ECG was recorded initially and after 15 and 30 days treatment. At the end, under anaesthesia, heart were isolated and perfused by Krebs-Henseleit solution in a Langendorff apparatus. Ischemia were induced by adding norepinephrine 10^{-6} M to the solution (2 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}$) during 1 h. Glycogen ($\text{mg}\cdot 100\text{ mg}^{-1}$ wet tissue) was measured on heart at rest or after perfusion, using the fenol sulfuric method. In another group, after anaesthesia hearts were removed, cleaned and fixed in phormoldheyde in PBS buffer. Thin ventricle sections were made and after paraffin

embedding, fine slices were cut and stained with hematoxylin eosin (HE). Ventricle glycogen assay was performed on those slides using the acid Schiff process. The number of nuclei was counted out and nuclei area was measured (μm^2). Glycogen granules were recognized the violet colored cytoplasm. **Results:** After 15 and 30 days, glycemia, QT interval and its derivatives increased on diabetic rats. On the other hand, diabetic rats treated during 30 days by low and intermediate doses of metformin (3.5 and $30 \mu\text{g.g}^{-1}$ b.w.) or glibenclamide or glibenclamide plus metformin, all decreased glycemia. However, the group treated with the highest dose of metformin ($74 \mu\text{g.g}^{-1}$ b.w) failed to reduce glycemia. On the other hand, the groups treated by low and intermediate doses reduced the ECG intervals: QTc, and QTd, and QTcd, in contrast to the diabetic group treated with the highest metformin dose and the groups treated by glibenclamide and glibenclamide associated to metformin. Metformin, in low and high doses (3.5 , 30 and $74 \mu\text{g.g}^{-1}$ b.w.) increased glycogen storage on diabetic rat ventricle, from 0.19 ± 0.007 (control group) to $0.38 \pm 0.007 \text{ mg.100 mg}^{-1}$, $0.5 \pm 0.05 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ and $0.7 \pm 0.04 \text{ mg.100 mg}^{-1}$, $p < 0.05$, respectively. The treatment with glibenclamide alone or associated to metformin increased glycogen, too. In the control group, isolate hearts showed a rapid increase on ventricular pressure, just initiation of NE perfusion ($145 \pm 9.7 \text{ mmHg}$), followed by a slow fall to $99 \pm 3 \text{ mmHg}$. Similar changes was found on the derivatives DP/Dt^+ and DP/Dt^- . Metformin (3.5 and $30 \mu\text{g.g}^{-1}$), glibenclamide and glibenclamide associated to metformin protected cardiac muscle during ischemia, similarly to the control group ($p > 0.05$). But, the non-treated diabetic group and the group treated by $74 \mu\text{g.g}^{-1}$ of metformin, produced a maximal pressure which were inferior to the control group and the reversion of the LVP, DP/Dt^+ and DP/Dt^- was faster than that of the control group. After ischemia, glycogen was reduced on all groups to $0.09 \pm 0.007 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ on control group; $0.1 \pm 0.006 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ on diabetic group and $0.06 \pm 0.005 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ on DM74. However, this decrease was inferior to that of the group treated by the highest dose. The treatment with glibenclamide alone and associated to metformin diminished glycogen storage from $0.62 \pm 0.05 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ to $0.19 \pm 0.05 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ and $0.74 \pm 0.03 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ to $0.22 \pm 0.008 \text{ mg.100 mg}^{-1}$. However its

utilization was proportional for all groups. Heart submitted to ischemia decreases its reserve, ($p < 0.05$ compared to non-ischaemic). These results suggested that high doses metformin, in special $74 \mu\text{g.g}^{-1}$ b.w., indicated as maximal for humans, makes heart prompt to ischemia. Diabetic rat hearts showed an increase on the amount of nuclei, from 21.33 ± 1.17 to 36.6 ± 5 ($p < 0.05$) and a reduction of its area, from $0.16 \pm 0.02 \mu\text{m}^2$ to $0.08 \pm 0.01 \mu\text{m}^2$ ($p < 0.05$) in comparison to the control group. The lowest dose of metformin (DM 3.5) diminished the amount of nuclei (36.6 ± 5 vs 22.8 ± 2 ; $p < 0.05$) and increased theirs size (0.08 ± 0.01 vs 0.17 ± 0.01). The amount of nuclei increased to 34.16 ± 1.85 and 47.29 ± 2.92 during the treatment with high metformin doses, (30 and $74 \mu\text{g.g}^{-1}$ b.w., respectively), and the nuclei area increased to $0.86 \pm 0.05 \mu\text{m}^2$ and $0.5 \pm 0.06 \mu\text{m}^2$, respectively, differing from control and non-treated diabetic groups. Similar result, was obtained on the group treated by glibenclamide and/or metformin, on cardiac cells, which the nuclei area increased to $0.71 \pm 0.09 \mu\text{m}^2$ and $0.67 \pm 0.01 \mu\text{m}^2$, respectively, ($p < 0.001$). **Conclusions:** The increased dispersion of QT intervals during treatment may be subjacent to the risks of arrhythmias that predispose humans to sudden death. Results shown on Langendorff methodology indicate that contraction force decreased, suggesting that ventricle muscle were prone to ischemia. Then, high metformin doses ($74 \mu\text{g.g}^{-1}$), as indicated for humans, may cause damage to cardiac work during overload. High metformin doses, glibenclamide and glibenclamide associated to metformin increase the number of nuclei, as well, theirs size. Consequently, the ventricle hypertrophy due to an increased cellular activity may cause important injuries to cardiac structure and function. We can conclude that, the increased glycogen content on ventricle was associated to the severity and the duration of diabetes. Then, heart became more susceptible to the ischemia effects.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 APRESENTAÇÃO	9
1.2 FISIOLOGIA DO MÚSCULO CARDÍACO	11
1.2.1 Estrutura do Coração	11
1.2.2 Vascularização do Músculo Cardíaco	11
1.2.3 Ultraestrutura do Músculo Cardíaco	11
1.2.4 Mioglobinas do Músculo Cardíaco	13
1.2.5 Lipídeos do Miocárdio	13
1.2.6 Vias do Metabolismo Cardíaco	14
1.2.7 Condições Patológicas	16
1.2.8 Eletrofisiologia do Coração	17
1.2.9 Eletrocardiografia	18
1.2.10 Ciclo Cardíaco	22
1.3 DIABETES MELLITUS	24
1.4 METFORMINA	30
1.5 GLIBENCLAMIDA	33
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Animais	39
3.2 Indução do Diabetes Mellitus	40
3.3 Eletrocardiograma	40
3.4 Coração Isolado de Rato pelo Método de Langendorff	41
3.5 Procedimentos Cirúrgicos	41
3.6 Protocolo de Perfusão - Isquemia	43
3.7 Determinação do Glicogênio	43
3.8 Determinação da Glicose no Plasma	43
3.9 Histologia	43
3.10 Corantes Histológicos	44
3.11 Análise Estatística	44
4. RESULTADOS	45
4.1 Efeitos do Diabetes	46
4.2 Efeitos do Tratamento com Metformina	47
4.3 Efeitos do Tratamento com Glibenclamida	51

4.3 Efeitos da Associação Metformina (3,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pc) e Glibenclamida no Tratamento de Ratos Diabéticos	53
4.4 Figuras	57
5. DISCUSSÃO	76
5.1. Efeitos do Diabetes	77
5.2. Efeitos da Metformina	80
5.3 Efeitos do Tratamento com Glibenclamida	83
5.4 Efeitos da Associação Metformina e Glibenclamida	86
6. CONCLUSÃO	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
8. APÊNDICE – TRABALHOS SUBMETIDOS	101
The Effects of Metformin on QT and QTc Interval Dispersion of Diabetic Rats	103
High doses of metformin decrease contractile force underperfused diabetic rat hearts with added norepinephrine.	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Fases do eletrocardiograma em repouso	18
Figura 2 – Fórmula estrutural da glibenclamida	31
Figura 3 – Mudanças na glicemia após indução de diabetes por aloxana	57
Figura 4 – Mudanças nos intervalos QT, QTc, QTd e QTcd após 15 e 30 dias de tratamento com metformina	58
Figura 5 – Mudanças no armazenamento de glicogênio do coração não perfundido após indução e diabetes e após tratamento com metformina por 30 dias	59
Figura 6 – Regiões do ventrículo de ratos não diabéticos (controle)	59
Figura 7 - Regiões do ventrículo de ratos diabéticos	60
Figura 8 - Regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com baixas doses de metformina ($3.5 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ pc}$)	60
Figura 9 - Regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com doses intermediárias de metformina ($30 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ pc}$)	61
Figura 10 - Regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com altas doses de metformina ($74 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ pc}$)	61
Figura 11 – Mudanças na pressão sistólica ventricular, dP/dt^+ e dP/dt^- nos grupos controle, diabetes, Diabetes Metformina $3,5 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ pc}$, Diabetes Metformina ($30 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ pc}$) e Diabetes Metformina ($74 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ pc}$) após 60 minutos de perfusão com noradrenalina	62
Figura 12 – Alterações no glicogênio ventricular de corações antes e após perfusão por 60 minutos com noradrenalina após indução de diabetes por aloxana e após 15 ou 30 dias de tratamento com metformina	63
Figura 13 – Efeito dose resposta da metformina sobre o número de núcleos das células do ventrículo cardíaco	64

Figura 14 – Efeito dose resposta da metformina sobre a área do núcleo das células do ventrículo cardíaco_____	64
Figura 15 – Regiões do ventrículo de ratos não diabéticos (controle) mostrando a área e a quantidade de núcleos _____	65
Figura 16 – Regiões do ventrículo de ratos diabéticos mostrando a área e a quantidade de núcleos _____	65
Figura 17 - Regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com baixas doses de metformina ($3.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ pc) mostrando a área e a quantidade de núcleos _____	66
Figura 18 – Regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com doses intermediárias de metformina ($30 \mu\text{g.g}^{-1}$ pc) mostrando a área e a quantidade de núcleos _____	66
Figura 19 - Regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com altas doses de metformina ($74 \mu\text{g.g}^{-1}$ pc) mostrando a área e a quantidade de núcleos_____	67
Figura 20 – Mudanças na glicemia após indução de diabetes por aloxana e após 15 e 30 dias de tratamento com metformina e/ou glibenclamida_____	68
Figura 21 – Mudanças nos intervalos QT, QTc, QTd e QTcd após 15 ou 30 dias de tratamento com metformina e/ou glibenclamida_____	69
Figura 22 – Conteúdo de glicogênio ($\text{mg.}100 \text{ mg}^{-1}$) de coração não perfundido após indução de diabetes por aloxana e após tratamento com metformina (M) e/ou glibenclamida (G) por 30 dias_____	70
Figura 23 – Regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com glibenclamida com detalhes da quantidade de glicogênio_____	71
Figura 24 – Regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados coma associação metformina e glibenclamida com detalhes da quantidade de glicogênio_____	71

Figura 25 – Mudanças na pressão sistólica ventricular, dP/dt^+ e dP/dt^- nos grupos Controle, Diabetes, Diabetes Metformina $3,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ pc, Diabetes Glibenclamida e Diabetes Metformina/Glibenclamida após 60 minutos de perfusão com noradrenalina_____72

Figura 26 – Alterações no glicogênio ventricular de corações antes e após perfusão por 60 minutos com noradrenalina após indução de diabetes por aloxana e após tratamento com metformina e/ou glibenclamida_____73

Figura 27 – Efeito do tratamento com metformina e/ou glibenclamida sobre o número de núcleos das células do ventrículo cardíaco_____74

Figura 28 – Efeito do tratamento com metformina e/ou glibenclamida sobre a área do núcleo das células do ventrículo cardíaco_____74

Figura 29 – Regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com glibenclamida mostrando detalhes da área e da quantidade de núcleos_____75

Figura 30 – Regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com a associação metformina e glibenclamida mostrando detalhes da área e da quantidade de núcleos_____75

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP – Monofosfato de Adenosina

AMPK – Proteína Quinase Ativada por AMP

ATP – Trifosfato de Adenosina

C - Controle

CP – Fosfato de Creatina

D – Diabetes

DG – Diabetes + Glibenclamida

DGM – Diabetes + Glibenclamida + Metformina

DM – Diabetes + Metformina

ECG – Eletrocardiograma

Fig – Figura

G6P – Glicose 6 Fosfato

Hb - Hemoglobina

HDL – Lipoproteínas de Alta Densidade

HE – Hematoxilina Eosina

IDDM – Diabetes Mellitus Dependente de Insulina

K_{ATP} – Canal de Potássio Sensível à ATP

LDL – Lipoproteínas de Baixa Densidade

LVP - Pressão do Ventrículo Esquerdo

pc – Peso Corporal

M – Molar

NE – Noradrenalina

NIDDM – Diabetes Mellitus não Dependente de Insulina

PAS – Protocoloco de Ácido Schiff

QTd – Dispersão do Intervalo QT

QTcd – Dispersão do Intervalo QTc

UKPDS – United King Prospective Diabetes Study

VLDL – Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade

Capítulo

1

INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO

Diabetes é uma desordem metabólica caracterizada pelo aumento da glicemia, devido a alterações no metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos, resultante de secreção deficiente ou de resistência periférica à insulina. Estas alterações aumentam a tendência ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e neuropatias, as quais representam uma das maiores causas de morte de pacientes (SMITH, T. W. 1992; PAULSON, 1996, BALKAU et al, 2004; SUAREZ et al, 2005).

As alterações do metabolismo lipídico aumentam os riscos de aterosclerose e de outras doenças cardiovasculares como: hipertensão arterial, isquemia e hiperlipoproteinemia (BODEN, 1997). Além destas, as mudanças no metabolismo de carboidratos do próprio músculo cardíaco também podem promover complicações cardíacas (HIGUCHI et al, 1991). Nos diabéticos, o aumento da concentração de glicogênio no ventrículo cardíaco (HIGUCHI et al, 1995, da SILVA, 2002, GONÇALVES et al, 2002), aparentemente está associado à gravidade do diabetes (HIGUCHI et al, 1995; RAJAKUMAR et al, 2004).

Embora este aumento represente uma proteção ao miocárdio durante a isquemia de curta duração, não tem o mesmo efeito na isquemia de longa duração, pois o glicogênio é rapidamente degradado devido ao aumento da atividade da glicogênio fosforilase (HIGUCHI et al, 1995; RAJAKUMAR et al, 2004).

Fármacos, como a biguanida metformina, um anti-hiperglicemiante utilizado no tratamento de diabéticos tipo 2, contribuem para a diminuição da glicemia e a melhoria do perfil metabólico. Além dos efeitos indiretos da metformina favorecerem a diminuição da resistência tecidual à insulina ela parece oferecer proteção contra doenças cardiovasculares, que afetam particularmente os obesos, dislipidêmicos e hipertensos. Em contraposição,

nossos resultados mostraram que altas doses de metformina, como as recomendadas a pacientes humanos, promoveram grande aumento de glicogênio cardíaco em ratos aloxanizados.

Em diversas situações a metformina tem sido associada a outros fármacos, tal como, a glibenclamida, a qual estimula a secreção de insulina. Segundo OLSSON et al (2000) esta associação aumenta o efeito anti-hiperglicemiante do tratamento. Todavia, esta associação pode aumentar os riscos de dano sobre o sistema cardiovascular e, conseqüentemente, o seu uso tem sido reavaliado (UKPDS Group, 1998, OLSSON et al, 2000; FISMAN et al, 2004).

Dados preliminares de nosso laboratório (GONÇALVES et al, 2003) mostraram que altas concentrações de metformina, equivalentes às doses diárias recomendadas a pacientes humanos, induziram aumento no conteúdo de glicogênio do ventrículo de ratos diabéticos em relação ao grupo não tratado. Por outro lado, doses mais baixas induziram aumento menor no conteúdo de glicogênio ventricular. Modificações metabólicas e as conseqüentes mudanças no armazenamento de glicogênio podem interferir na resposta do miocárdio à isquemia. Assim sendo, é importante estabelecer se as altas doses de metformina, assim como, a sua associação com a glibenclamida, poderia prejudicar o metabolismo lipídico e as funções do músculo cardíaco de diabéticos.

1.2 FISIOLOGIA DO MÚSCULO CARDÍACO

1.2.1 Estrutura do Coração

O coração dos mamíferos é um órgão muscular globular com quatro câmaras e um esqueleto fibroso, composto de quatro anéis tendinosos em torno de seus quatro orifícios valvulares. O anel aórtico é o mais forte de todos; embora os outros anéis sejam menos rígidos, e firmes o bastante para resistir às dilatações. A musculatura atrial é fina, translúcida, situando-se acima dos ventrículos. Em contraste, o músculo ventricular, é grosso, opaco e composto de três lados: um superficial, um medial e outro interno. A parede do ventrículo esquerdo é de duas a três vezes mais grossa que a parede do ventrículo direito. Os dois ventrículos são anatomicamente separados por um septo (LICATA & ROBERTS, 1959; ANDERSON et al, 2004).

1.2.2 Vascularização do Músculo Cardíaco

O coração é nutrido pelas artérias coronárias que terminam em uma rica rede de capilares. Estes capilares formam um plexo que inserem entre fibras musculares individuais. A quantidade de capilares no músculo cardíaco é três a quatro vezes maior do que no músculo esquelético, suprindo o coração com um fluxo sangüíneo, em média, vinte vezes maior (GREEN, 1959; ANDERSON et al, 2004).

1.2.3 Ultraestrutura do Músculo Cardíaco

As células musculares do coração formam um sincício composto de várias fibras ramificadas. O seu núcleo oval é centralizado e o material intranuclear é condensado dentro de uma estrutura reticulada que pode mudar sua aparência durante a contração ou

relaxamento da célula. Em torno de cada núcleo há um acúmulo de sarcoplasma granular. O sarcoplasma é composto de matriz intracelular homogênea contendo organelas e miofibrilas.

O sarcolema das células cardíacas é mais fino do que de músculos esqueléticos, possibilitando menor resistência à difusão de gases e substratos neste músculo aeróbio. Em microscopia eletrônica, o sarcolema do coração aparece como uma dupla membrana, separado por um pequeno espaço. A membrana interna é mais densa do que a externa e é conhecida como a membrana plasmática (PERRY, 1960; KOBAYASHI & SOLARO, 2005).

O músculo cardíaco também é caracterizado pela presença de discos intercalares que servem de comunicação entre células por todo o músculo. Os discos intercalares apresentam invaginações e fusão das membranas plasmáticas (MOORE & RUSKA, 1957; SHIMADA et al; KOBAYASHI & SOLARO, 2005).

A linha Z é uma estrutura helicoidal contínua unindo as fibrilas entre si fundindo-se com a membrana plasmática nas margens da célula. Os miofilamentos prosseguem sem interrupções de um sarcômero a outro conectando-se através da linha Z (PERRY, 1956; KOBAYASHI & SOLARO, 2005).

O músculo cardíaco é rico em mitocôndrias. Elas possuem membrana dupla, sendo que a membrana interna se ramifica em numerosas cristas, onde se situam as enzimas que forma a cadeia respiratória terminal responsável pelo metabolismo aeróbio (HOGEBOM et al, 1948). As mitocôndrias livres no sarcoplasma estão situadas próximas a miofibrilas. Os grânulos de glicogênio e, mais raramente, gotículas de gordura também são encontradas nas células musculares cardíacas (PERRY, 1956; MARIN-GARCIA & GOLDENTHAL, 2004).

1.2.4 Mioglobinas do Músculo Cardíaco

O músculo cardíaco e o esquelético vermelho são caracterizados pela presença de pigmentos vermelhos de mioglobina no sarcoplasma. As mioglobinas estão conjugadas a proteínas que contêm um grupo prostético ferritina, que está relacionado à hemoglobina (MILLIKAN, 1939).

A mioglobina é um carreador de oxigênio presente em grande quantidade em músculos vermelhos em resposta à demanda mitocondrial por oxigênio, além de transportar oxigênio do sarcolema para a mitocôndria de células musculares vermelhas no coração. Este é um processo molecular, chamado de difusão facilitada de oxigênio (SCHNEIDER & HOGEBOM, 1956; WITTENBERG & WITTENBERG, 2003) em virtude de sua finalidade.

1.2.5 Lipídeos do Miocárdio

O coração é relativamente rico em complexos lipídicos. Estes são, em grande parte fosfatídeos e componentes relacionados. Há também quantidade moderada de colesterol e uma pequena quantidade de triglicerídeos em condições normais. Estes lipídeos estão contidos no interior das organelas da célula. A mitocôndria e o retículo endoplasmático apresentam uma grande quantidade de lipídeos (94% de fosfolípidos e 6% de colesterol) (SPIRO & McKIBBEN, 1956).

1.2.6 Vias do Metabolismo Cardíaco

O processo metabólico no músculo cardíaco pode ser dividido em três fases: conservação de energia, liberação de energia e utilização de energia. A fase de liberação de energia inclui aquelas reações pelas quais as ligações de carbono-carbono e carbono-hidrogênio são oxidadas liberando energia sob a forma livre. Os processos de glicólise, oxidação de ácidos graxos livres e as reações terminais oxidativas do ciclo de Krebs ocorrem nesta fase.

A fase de conservação de energia inclui principalmente os processos de fosforilação oxidativa, pelo qual a energia do hidrogênio é convertida em trifosfato de adenosina (ATP) e fosfato de creatina (CP). O processo de armazenamento de glicogênio no músculo cardíaco também é um processo de conservação de energia.

A fase de utilização de energia inclui uma variedade de processos anabólicos envolvidos nos trabalhos químicos e nos processos de contração (LEHNINGER et al, 1958; LUIKEN et al, 2003).

Metabolismo de glicose

A utilização de glicose no coração é maior do que em outros músculos, apesar do miocárdio também utilizar outros substratos como os ácidos graxos, lactato, corpos cetônicos e aminoácidos. Recentes evidências indicam que o transporte e a utilização de glicose pelas células do músculo cardíaco é de grande importância para a manutenção de sua função normal. Além disso, uma alta taxa de metabolismo de glicose pode ser crucial em condições fisiopatológicas, tal como, durante a isquemia (McVEIGH & LOPASCHUK, 1990; LOCHNER et al, 1996).

Segundo MORGAN et al (1965), sob condição basal ou de trabalho forçado, assim como, sob anoxia, a glicose é transportada através da membrana no coração.

O transporte de glicose em cardiomiócitos é regulada por vários fatores, dentre eles: hormônios como a insulina, a própria função contrátil e maior ativação do sistema nervoso central, via inervação simpática.

A insulina induz um rápido aumento do transporte de glicose (ZANINETTE et al 1988), porém, sob hipóxia ou isquemia, o transporte de glicose não requer insulina (SUN et al, 1994; ZORZANO et al, 1997).

O próprio ato contrátil também estimula o transporte de glicose em cardiomiócitos, pois ativa a translocação de GLUT4 para a membrana (KOLTER et al, 1992; WHEELER et al, 1994). Isto ocorre, em virtude do trabalho contrátil promover a ativação da proteína quinase ativada (AMPK), cuja função é aumentar a transcrição de GLUT 4 para a membrana plasmática (ZHENG et al, 2001) auxiliando o transporte de glicose independente da presença de insulina.

O sistema nervoso central também controla o transporte de glicose. A estimulação elétrica do hipotálamo aumenta a captação de glicose pelos cardiomiócitos via inervação simpática intermediada pela liberação de catecolaminas e serotonina, estimulando a translocação de GLUT4 e GLUT1 para a membrana (FISCHER et al, 1996 (a); FISCHER et al, 1996 (b); ZORZANO et al, 1997). O efeito das catecolaminas é independente da contração cardíaca e da presença de insulina e se deve à ativação de receptores α_1 -adrenérgicos (FISCHER et al, 1996(a)).

O peróxido de hidrogênio, produzido a partir da via glicose oxidase, estimula a secreção de serotonina (BOSIN , 1990). A serotonina liberada estimula o transporte de GLUT

para a membrana, por mecanismo desconhecido, aumentando a captação de glicose (HAJDUCH et al, 1999).

O transporte de glicose também pode ocorrer pela inibição da oxidação de ácidos graxos (ciclo de Randle) (RANDLE, 1998). Este fato ocorre sempre que o coração estiver em débito de oxigênio, ou seja, durante isquemia, anóxia ou exercício físico exaustivo.

Metabolismo de ácidos graxos

Os ácidos graxos e os produtos de sua oxidação, o ácido β -hidroxobutírico e o ácido acetoacético são rapidamente oxidados pelo músculo cardíaco, podendo contribuir com 80% da energia requerida para efetuar o trabalho cardíaco (LEHNINGER et al, 1958).

Os distúrbios regionais da contratilidade ventricular, tal como aquele proporcionado pela isquemia, pode reduzir a função da bomba cardíaca. Com a privação aguda de oxigênio, os ácidos graxos livres não podem ser oxidados tornando o coração dependente da produção anaeróbia de energia. Nestas condições, a produção de ATP depende, grandemente, da disponibilidade de substratos intracelulares armazenados. Nestes casos, as reservas de glicogênio são utilizadas como substrato glicolítico adicional durante a isquemia, retardando o processo de rigidez cardíaca que pode ocorrer em virtude da insuficiência ventricular esquerda (SELWYN & BRAUNWALD, 1998).

1.2.7 Condições Patológicas

Cardiopatia Isquêmica

A isquemia decorre da deficiência no aporte de oxigênio para o músculo cardíaco. Conseqüentemente é desencadeado o processo de aumento na liberação de noradrenalina. A oxigenação inadequada do coração pode promover distúrbios nas funções mecânicas,

bioquímicas e elétricas. Ocorrem mudanças na utilização dos substratos, pois na ausência de oxigênio, a glicose será a principal fonte de energia. A isquemia também produz alterações no ECG devido a alterações no processo de repolarização da membrana, causando inversão da onda T ou também promovendo o deslocamento do intervalo ST (SELWYN & BRAUNWALD, 1998).

A causa mais comum de isquemia é a esclerose coronariana, a qual produz estreitamento das artérias pelo acúmulo de gordura, em virtude do aumento de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e da diminuição das lipoproteínas de alta densidade (HDL) (BODEN, 1997).

1.2.8 Eletrofisiologia do Coração

As fases do potencial de ação cardíaco estão associadas a variações da permeabilidade da membrana aos íons sódio, potássio e cálcio. Assim como nas demais células, devido à alta permeabilidade da membrana, o íon K^+ é o principal cátion, enquanto no exterior predominam os cátions Na^+ e Ca^{2+} . De modo semelhante, a membrana da fibra muscular cardíaca, gera um potencial de ação quando seus respectivos canais se abrem.

Embora a atividade destes canais iônicos seja constantemente variável, dando origem à atividade contrátil rítmica, ela pode ser afetada por diversos fatores, tais como: neurotransmissores, hormônios e “fatores locais”: variação na concentração de O_2 e CO_2 no plasma e a própria atividade contrátil, entre outros. Uma importante via de comunicação intercelular é formada pelas junções comunicantes (“gap junctions”) que possibilitam trocas de íons e de pequenas moléculas entre células vizinhas.

As variações do fluxo de K^+ , Na^+ e da atividade das bombas de Na^+/K^+ e de Ca^{2+} principalmente, promovem automaticamente as alterações do potencial de membrana dando

origem ao potencial de ação cardíaco. Durante o potencial de ação são reconhecidas 4 fases. Na fase 0, ocorre a abertura dos canais rápidos de Na^+ , despolarizando a membrana. Entretanto, a quantidade de Na^+ que entra na célula é pequena não produzindo modificação da concentração de Na^+ intracelular. Posteriormente há entrada de maior quantidade de Na^+ , tornando o interior da célula positivo. A inversão do gradiente elétrico promove o fechamento de canais rápidos de Na^+ e reduz a sua entrada. Na fase 1 ocorre efluxo de K^+ , provocando uma breve e limitada repolarização. Na fase 2, a fase de platô, ocorre a abertura dos canais de Ca^{2+} e dos canais lentos de Na^+ , promovendo a entrada deste íons na célula. É nesta fase que também ocorre um efluxo de K^+ , contrabalanceando o efeito das correntes de entrada. Na fase 3, a fase de repolarização, o efluxo de K^+ excede o influxo de Ca^{2+} e de Na^+ completando-se a repolarização e o potencial de membrana retorna ao seu nível mais polarizado. As trocas iônicas de Na^+ e de K^+ ativam a bomba de Na^+/K^+ ATPase e de Ca^{2+} ATPase restabelecendo a condição de repouso da célula. A fase 4 representa o período entre o término da repolarização e o início do potencial de ação seguinte (ROCHA E SILVA, 1999).

1.2.9 Eletrocardiografia

O eletrocardiograma é um dos métodos mais importantes no diagnóstico de cardiopatias. Dependendo da extensão e das áreas lesadas, a propagação do potencial de ação no músculo cardíaco altera as ondas do ECG e os respectivos intervalos.

O eletrocardiograma (ECG) é registrado utilizando eletrodos conectados aos braços e às pernas para registrar as variações do potencial elétrico contra um potencial de referência em cada batimento cardíaco. O desenvolvimento do potencial de ação das células musculares cardíacas gera uma corrente elétrica que se difunde pelos líquidos corporais e,

rapidamente, alcança a superfície do corpo (LENGYEL, 1974). O conhecimento desta propriedade de condução através dos fluidos corporais permite registrar, de modo não invasivo, eventos que ocorrem no coração.

As ondas do ECG decorrem da somatória temporal de despolarizações e repolarizações em grupos de fibras cardíacas. A seqüência normal de ativação cardíaca (nódulo sinusal, aurículas, nódulo atrio-ventricular, feixe de His, rede de Purkinge e massa ventricular) determina a seqüência e as durações dos três primeiros elementos do registro: a onda P, o complexo QRS e a onda T.

A onda P corresponde à deflexão produzida pela despolarização auricular, iniciada a partir do nódulo sinusal e que se espalha em ondas de ativação, via feixes condutores internodais para o ventrículo. A onda seguida é a Q, registrada como uma deflexão negativa inicial, resultante da despolarização do septo ventricular, seguida imediatamente pela onda R, a primeira deflexão positiva, devido à despolarização do ápice ventricular e pela onda S, outra deflexão negativa, correspondente à despolarização da base ventricular. Estas três ondas formam o complexo QRS, que corresponde ao período total da despolarização ventricular. A onda T, que se segue ao complexo QRS, é uma deflexão positiva gerada pela repolarização ventricular. Esta onda é mais lenta e de menor amplitude que o complexo QRS. A onda U, que é a responsável pela lenta repolarização do sistema condutor intraventricular (sistema de Purkinge) (LENGYEL, 1974; ROCHA E SILVA, 1999), não é sempre evidente; aparecendo com maior freqüência após a realização de exercício físico e nos casos de hipopotassemia (SILVEIRA & ARAUJO, 1960).

As ondas do ECG permitem distinguir intervalos que correspondem ao tempo para ativar as regiões do músculo cardíaco. As ondas, bem como, os intervalos entre elas, estão ilustrados na figura 1:

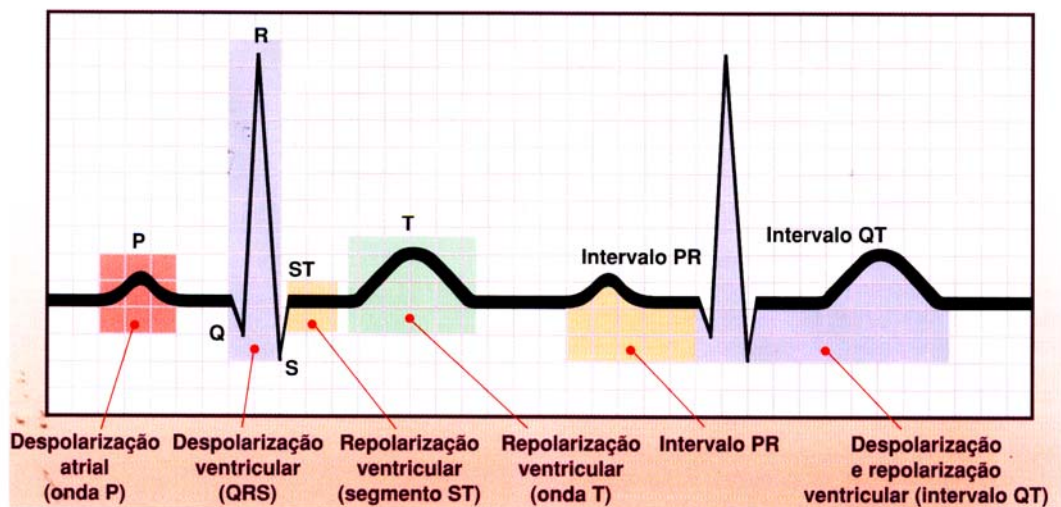


Figura 1: fases do eletrocardiograma em repouso (WILMORE & COSTIL, 2001).

Os segmentos de registro do ECG, mostrando as ondas P e seus intervalos estão identificados, e corresponde ao tempo desde o início da ativação sinusal ao início da despolarização ventricular. A duração do complexo QRS, que corresponde ao tempo total para a despolarização ventricular, tem início no feixe de His e se alastra pelo tecido condutor His-Purkinge com alta velocidade para toda massa ventricular contrátil. O intervalo S-T inicia-se no final do complexo QRS e vai até o início da onda T. Este intervalo corresponde ao tempo que decorre desde o final da despolarização completa até o início da repolarização do ventrículo, ou seja, toda a fase de platô do potencial de ação. O intervalo R-R, que determina o tempo entre duas ondas R sucessivas, é utilizado rotineiramente para determinar a frequência cardíaca. O intervalo entre o início do complexo QRS e o fim da onda T é chamado de intervalo Q-T, que corresponde ao tempo necessário para a completa excitação elétrica e a recuperação dos ventrículos, sendo, portanto, a medida da duração da sístole “elétrica”, a qual inclui a despolarização e a repolarização ventricular (LENGYEL, 1974; ROCHA E SILVA, 1999). O intervalo Q-T varia com a frequência cardíaca. Por esta razão,

em 1920, Bazett's (citado por ARILDSEN, 1999) introduziu uma equação que permitiu corrigir este valor em função da frequência cardíaca:

$$QTc = \frac{Q-T}{\sqrt{R-R}}$$

Planos de Projeção - Vetores

Para fins de registro gráfico, o coração está no espaço e o seu estudo é feito em dois planos: um horizontal e outro frontal. Ao juntar os dois planos é possível determinar as direções dos vetores no espaço. A projeção do plano frontal é representada pelas derivações D₁, D₂, D₃, aVR, aVL e aVF. O plano horizontal é representado pelos vetores V₁, V₂, V₃, V₄, V₅ e V₆. O plano frontal mostra se a projeção está para cima ou para baixo, para a direita ou esquerda e o plano horizontal mostra se a projeção está para frente ou para trás. Ao juntar as duas projeções determina-se o vector no espaço.

O sistema de derivações eletrocardiográficas determina o vetor cardíaco resultante, que é a soma vetorial de toda a atividade elétrica do coração. Os vetores são formados pelos ombros direito e esquerdo e pela região pubiana formando um triângulo. As derivações periféricas dos membros I, II e III são orientadas sobre o plano frontal, em 0, 60 e 120 graus, respectivamente, em relação ao plano horizontal. Outras derivações unipolares dos membros ficam ao longo dos eixos de 90, -30 e -150 graus do plano horizontal.

Entre as seis linhas de derivação, o ângulo que as separa é de 30°. Passando-se todas as linhas de derivações para o centro do triângulo forma-se o sistema hexa-axial do plano frontal.

Por convenção, todos os ângulos para baixo são positivos, isto é, 30°, 60°, 90°, 120°, 150°, 180°, e para cima são negativos: -30°, -60°, -90°, -120°, -150°, -180°.

A posição da projeção do vetor cardíaco no plano frontal é determinada pelas ondas que este vetor forma nas seis derivações do plano frontal. A partir da positividade e negatividade das ondas, bem como pelo seu tamanho é determinada a posição do vetor no plano frontal (GUS, 1997).

1.2.10 Ciclo Cardíaco

Sístole Ventricular

O início da contração ventricular é representado pelo pico da onda R do eletrocardiograma. O tempo que decorre entre o início da sístole ventricular e a abertura das válvulas semilunares é chamado de contração isovolumétrica. Neste período a pressão ventricular aumenta, porém o volume ventricular não se modifica. Este aumento de pressão ocorre enquanto as válvulas semilunares ainda estão fechadas, sendo denominada DP/Dt positiva.

Quando as válvulas semilunares se abrem, inicia-se a fase de ejeção. Nesta fase, as pressões ventricular e aórtica, aumentam, sendo chamadas de pressão sistólica ventricular. Após o pico da curva do fluxo continuado do ventrículo esquerdo, este desacelera em virtude da inversão do gradiente de pressão. Nesta fase da ejeção, ocorre o encurtamento das paredes ventriculares para propulsionar o sangue (ROCHA & SILVA, 1999).

Diástole Ventricular

O intervalo entre o fechamento das válvulas semilunares e a abertura das válvulas átrio-ventriculares é chamado de relaxamento isovolumétrico. Nesta fase, diminui a pressão ventricular, sem que haja modificação do volume ventricular. A relação DP/Dt é negativa neste período.

Após a abertura das válvulas atrio-ventriculares ocorre o enchimento da câmara ventricular. Durante o enchimento a pressão ventricular esquerda cai a valores abaixo da pressão atrial. Esta fase é denominada pressão diastólica ventricular (ROCHA & SILVA, 1999).

1.3 DIABETES MELLITUS

No diabetes mellitus, ao lado de um menor transporte de glicose nos tecidos sensíveis à insulina, há também, uma grande produção de glicose pelo fígado. Estas anormalidades são decorrentes, principalmente, de insuficiente secreção de insulina em resposta à glicose e/ou da insensibilidade tecidual à ação da insulina (resistência à insulina). As causas do aparecimento do diabetes mellitus não são completamente conhecidas. Ao menos, uma predisposição é hereditária. Foram reconhecidos dez diferentes tipos de genes relacionados ao diabetes mellitus tipo 1, sendo que os mais importantes estão situados nos cromossomos 6 e 11, onde estão os genes responsáveis pela produção de insulina (TODD, 1995). O diabetes mellitus também pode ser causado por destruição de células β por drogas ou por doenças de origem viral ou desenvolver-se em decorrências de desnutrição ou gravidez. Modernamente, classifica-se o diabetes mellitus em dois tipos (EMILIEN et al, 1999).

O tipo 1 ou diabetes mellitus dependente de insulina (IDDM), anteriormente chamado diabetes juvenil porque manifesta-se com maior frequência em crianças e adolescentes (em torno de 12 anos idade). Nos indivíduos portadores de diabetes tipo 1, o pâncreas produz pouca ou nenhuma insulina. Esta é uma desordem auto-imune, na qual as células T ativadas infiltram-se nas ilhotas e provocam a destruição das células β . O tratamento do diabético tipo 1 é feito principalmente através de injeções de insulina e o controle do número e conteúdo das refeições. O médico deve levar em conta a sensibilidade de cada paciente aos efeitos da insulina exógena (EMILIEN et al, 1999).

Os principais sintomas do diabetes tipo 1 são: aumento de micção (frequência e volume), aumento da sede, perda de peso e cansaço. Estes sintomas são causados pelo aumento de glicose no sangue e de sua perda na urina. A perda de glicose e de água na

urina resulta em desidratação, o que provoca efeitos osmóticos e sede (BENNETT & CECIL, 1997).

Concomitantemente, há aumento do metabolismo lipídico e parte dos sub-produtos são convertidas a cetonas. Se esta produção for excessiva, haverá aumento de acidez no plasma que será eliminada na urina e no ar expirado, exalando um odor característico (hálito cetônico) (BENNETT & CECIL, 1997).

O diabetes do tipo 2, também chamado, diabetes mellitus não dependente de insulina (NIDDM), aparece mais freqüentemente em indivíduos com mais de 40 anos e em obesos mais jovens. Em geral, pode ser causada por diminuição da secreção de insulina por diminuição do número de células β ou por diminuição da sensibilidade destas à glicose ou por aumento da resistência periférica ao hormônio, como no caso de aumento de peso e por diminuição da atividade física (BENNETT & CECIL, 1997).

A hiperglicemia mantida causa a glicosilação não-enzimática das proteínas, o que altera a estrutura e função desta. Um exemplo é a glicosilação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais não são mais capazes de se ligarem aos receptores de LDL. Outro exemplo é a glicosilação da hemoglobina, um processo contínuo que ocorre no interior das hemácias, constituindo um histórico da concentração de glicose à qual a hemácia esteve exposta durante a sua vida (SHERWIN, 2004). Por esta razão a concentração de hemoglobina glicosilada é utilizada como um indicador do estado do diabético.

O diabetes também promove alterações no metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos. A hiperglicemia e a hiperlipidemia mantidos em diabéticos agravam ainda mais o quadro de resistência tecidual à insulina. Uma das conseqüências finais é a redução da atividade da glicogênio sintetase e/ou aumento da quebra de glicogênio aliada ao aumento da degradação dos triglicerídeos, com a resultante liberação de glicerol e de ácidos graxos

livres para o plasma (WESTERGAARD et al, 1991; DeFRONZO et al, 1992; LAWRENCE Jr et al, 1997). Em diabéticos do tipo 2, os ácidos graxos livres estão elevados devido ao aumento da lipólise. O aumento dos ácidos graxos livres compete com a glicose como substrato energético causando inibição da síntese de glicogênio via retroalimentação negativa sobre a captação de glicose que causa conseqüente aumento da glicemia (RANDLE et al, 1998).

O glicerol plasmático é originário da lipólise de triglicerídeos do tecido adiposo, bem como, da hidrólise dos alimentos gordurosos da dieta. O fígado é responsável por 70 a 90% da utilização do glicerol. Após ser captado, ele é irreversivelmente convertido a glicerol-3-fosfato, pela quinase do glicerol. O glicerol é o único substrato que provê novos carbonos para a gliconeogênese, em contraste com a geração de lactato e alanina, cujos carbonos são originados diretamente através da glicólise. Em diabéticos, aproximadamente 80% do glicerol é convertido em glicose, enquanto nos indivíduos não-diabéticos, esta conversão varia entre 40 e 60% (WESTERGAARD et al, 1998).

Dentre as anormalidades do metabolismo lipídico de diabéticos também estão incluídos o aumento de colesterol LDL e VLDL e a diminuição de HDL, além do aumento dos níveis plasmáticos de triglicerídeos (BARAKAT et al, 1996).

As modificações da composição de ácidos graxos, fosfolípidios e colesterol da membrana plasmática alteram as funções celulares, podendo ter conseqüências importantes na difusão de água e de pequenas moléculas, inclusive glicose (GOMEZ DUMM et al, 1998).

As alterações no metabolismo lipídico aumentam os riscos de aterosclerose, além de doenças cardiovasculares, tais como: hipertensão arterial, isquemia e hiperlipoproteinemia (BODEN, 1997). Estas disfunções cardíacas podem também ser ocasionadas pela glicosilação de glicoproteínas circulantes, alterando a sua renovação e contribuindo para

aumentar o risco de aterosclerose. Tem sido sugerido que as anormalidades da função das células endoteliais aumentam a probabilidade de lesões (SMITH, 1992).

Doenças cardiovasculares também podem ocorrer em virtude de mudanças no metabolismo de carboidratos do músculo cardíaco, gerando complicações durante uma isquemia prolongada (HIGUCHI et al, 1991).

Como referimos anteriormente (pg 9), a própria contração estimula o transporte de glicose em cardiomiócitos. O transporte de glicose é estimulado pela liberação das catecolaminas, que promovem a translocação de GLUT4 e GLUT1 para a membrana. Além dessas condições, a hipóxia, anóxia ou a isquemia causam aumento da utilização e transporte de glicose no músculo cardíaco, mesmo na ausência de insulina (ZORZANO et al, 1997).

Nos diabéticos, o aumento da concentração de glicogênio no ventrículo cardíaco (HIGUCHI et al, 1995, da SILVA, 2002, GONÇALVES et al, 2002), aparentemente está associado à gravidade do diabetes (HIGUCHI et al, 1995; RAJAKUMAR et al, 2004).

Embora este aumento represente uma proteção ao miocárdio durante a isquemia de curta duração, não tem o mesmo efeito na isquemia de longa duração, pois o glicogênio é rapidamente degradado devido ao aumento da atividade da glicogênio fosforilase (HIGUCHI et al, 1995; RAJAKUMAR et al, 2004).

Este aumento de glicogênio pode ser provocado por uma mutação no gene PRKAG2, que é uma subunidade regulatória na ativação da AMP kinase, e causa hipertrofia cardíaca e anormalidades eletrofisiológicas, particularmente na pré-excitação e bloqueio de ramo na condução átrio-ventricular (ARAD et al, 2001).

A causa mais comum de isquemia miocárdica é a aterosclerose das artérias coronárias epicárdicas. A redução da luz das artérias coronárias provocada pela

aterosclerose diminui a perfusão miocárdica no estado basal e limita os aumentos apropriados de perfusão durante a demanda aumentada (SELWYN & BRAUNWALD, 1998). A carência de oxigênio no tecido, provocada pela perfusão inadequada, resulta em desequilíbrio entre o aporte e a demanda de oxigênio, o que provoca distúrbios transitórios das funções mecânica, bioquímica e elétrica do miocárdio. Durante a isquemia, a contratilidade do miocárdio (inotropismo) é aumentada pela liberação reflexa de noradrenalina pelas terminações nervosas adrenérgicas no miocárdio, provendo aumento do débito cardíaco (SMITH, 1992). A isquemia transitória pode estar associada à angina no peito e quando for prolongada pode levar à necrose e fibrose do miocárdio. Por outro lado os distúrbios regionais da contratilidade ventricular podem reduzir a função da bomba cardíaca (SELWYN & BRAUNWALD, 1998). Com a privação grave de oxigênio, os ácidos graxos livres não podem ser oxidados, tornando o coração dependente da produção de energia anaeróbia. A produção anaeróbia de ATP é muito dependente da disponibilidade de substratos intracelulares para a glicólise. Nestes casos, as reservas de glicogênio são utilizadas como substrato glicolítico adicional durante a isquemia, retardando o processo de rigidez cardíaca que ocorre em virtude da insuficiência ventricular esquerda.

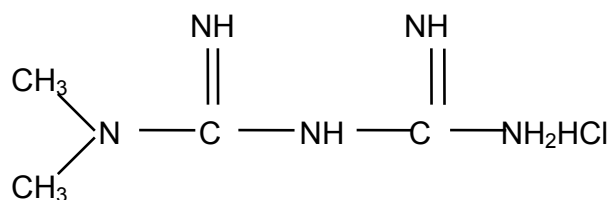
Como observado por diversos autores (HIGUCHI et al, 1995; FEUVRAY & LOPASCHUK, 1997; PAULSON, 1997), o metabolismo de carboidratos do músculo cardíaco de diabéticos é alterado. Em ratos diabéticos (por estreptozotocina) foi registrado no músculo cardíaco maior conteúdo de glicogênio do que no grupo de ratos não diabéticos, fato condizente com observações de nosso grupo (da SILVA, 2001; da SILVA et al, 2002). Este aumento poderia estar associado ao grau de severidade e à duração do diabetes, conforme sugerido por HIGUCHI et al (1995).

O aumento do conteúdo de glicogênio no músculo cardíaco pode prover substrato glicolítico adicional durante a isquemia (HIGUCHI et al, 1991; SCHAEFER & RAMASAMY, 1997; TAEGTMEYER, 1998). Baseado nestas informações, diversos autores (HIGUCHI et al, 1991; PAULSON, 1997; FEUVRAY & LOPASCHUK, 1997) sugeriram que o diabético estaria protegido durante a isquemia, desde que não houvesse acúmulo de lactato. O próprio HIGUCHI et al (1995), contudo, sugeriu que o diabético só estaria protegido durante a isquemia de curta duração. Neste trabalho, a maior parte do conteúdo de glicogênio cardíaco foi preservado mesmo após 15 minutos de perfusão em presença de noradrenalina. Porém, após 1 hora de perfusão, o conteúdo de glicogênio havia sido reduzido a valores inferiores aos de ratos não diabéticos sujeitos às mesmas condições. Como consequência, a manutenção da estimulação com noradrenalina causou aumento da rigidez do ventrículo esquerdo (HIGUCHI et al, 1995), que foi acompanhada pela diminuição do fluxo cardíaco. A rigidez diastólica no ventrículo esquerdo foi atribuída à contratura miocardial (HIGUCHI et al, 1997). O autor sugeriu que, sob estas condições, há maior atividade da glicogênio fosforilase no músculo cardíaco nos diabéticos, e que o conteúdo aumentado de glicogênio, apenas protege o ventrículo durante a isquemia de curta duração.

1.4 METFORMINA

Uma das prioridades no tratamento do diabetes é diminuir a glicemia para reduzir as complicações micro- e macro-vasculares. A abordagem padrão tem sido a prática de exercício físico e dietas. Quando estas práticas não são suficientes para baixar a glicemia, há necessidade de adicionar medicamentos à terapia, levando em conta a origem das implicações e à sua gravidade. Agentes orais, como as sulfoniluréias, metformina, as tiazolidinas (troglitazona e rosiglitazona) e acarbose tem sido utilizadas como monoterapias.

A metformina é uma biguanida, cuja fórmula estrutural é:



As biguanidas, conhecidas de longa data, foram utilizadas no tratamento de diabetes já em 1920 (DAWIS & GRANNER, 1996). Fenformin, a primeira a ser utilizada, foi retirada do mercado pois seu uso foi associado à cetoacidose que afetava indivíduos com deficiências hepáticas e renais. Metformina tem sido utilizada a longo tempo para tratar do diabetes tipo 2 na Europa e mais recentemente nos Estados Unidos e Brasil. Metformina tem sido utilizada no tratamento do diabetes tipo 2, sozinha ou em associação com outras drogas, pois melhora o controle glicêmico e lipídico em pacientes que não respondem à dieta alimentar (De FRONZO & GOODMAN, 1995; HOWLETT & BAILEY, 1999). Em contraste com as sulfoniluréias, metformina promove a perda de peso do diabético, não aumenta a secreção de insulina e não causa hipoglicemia. Conseqüentemente, a metformina favorece a diminuição da resistência à insulina.

Recentemente, também foi demonstrado que ela protege contra doenças cardiovasculares, particularmente, em obesos, dislipidêmicos e hipertensos (HOWLETT & BAILEY, 1999). Em conjunto, vários efeitos da metformina reduzem a glicemia: supressão da saída de glicose hepática, estimulação da captação de glicose pelas células musculares, estimulação do aumento do armazenamento de glicogênio e inibição da oxidação de ácidos graxos (RICCIO et al, 1991; STUMVOLL et al, 1995; da SILVA, 1998, BAILEY, 1999).

O mecanismo de ação da metformina é multifatorial, mas ainda não é completamente conhecido. Tem sido sugerido que metformina pode ativar o mecanismo de ação da insulina, aumentando a atividade do receptor de insulina levando a translocação dos transportadores de glicose GLUT4 para a membrana plasmática dos músculos esqueléticos (HOWLETT & BAILEY, 1999). Contudo, a presença de insulina é necessária para que o efeito da metformina se manifeste (BAILEY, 1995) o que parece envolver o prolongamento do efeito da insulina na célula.

Nos músculos esqueléticos, tecido adiposo e fígado a metformina aumenta a oxidação de glicose e diminui a oxidação de ácidos graxos livres. Entretanto, metformina talvez possa também afetar a oxidação de glicose e ácidos graxos livres em outros tecidos, inclusive nas células β . Estes efeitos são importantes para o tratamento de diabéticos pois, quando os ácidos graxos livres estão em excesso, a oxidação de glicose diminui (ciclo de Randle), principalmente pela inibição da atividade da piruvato desidrogenase (PATANÈ et al, 2000).

Outra proposta do mecanismo de ação da metformina é sugerida por ZHOU et al, (2001), ao estudar os efeitos da metformina sobre a ativação de AMPK (proteína quinase ativada por AMP). AMPK é uma subunidade alvo capaz de mediar os efeitos metabólicos da metformina. A clivagem desta quinase é uma etapa regulatória na biossíntese de lipídeos, fosforilando e inativando enzimas chaves como a Acetil-CoA carboxilase. A AMPK também

regula o metabolismo de ácidos graxos e conseqüentemente, aumenta a captação de glicose (ciclo de Randle) e estimula a gliconeogênese pela estimulação da glicose 6 fosfato fosfatase (G6P). A ativação crônica de AMPK também induz a expressão da hexoquinase e de transportadores GLUT 4 reproduzindo os efeitos proporcionados pela prática de exercícios físicos.

Todavia, o tratamento com metformina não é isento de efeitos colaterais. Estudos demonstraram que metformina, em altas doses, pode reduzir a responsividade das células β ao aumento de glicose e em caso de exposição prolongada pode resultar em apoptose (KEFAS et al, 2004).

Além disso, foram observados que cerca de 20% dos pacientes, no início do tratamento, relataram: desconforto abdominal, sabor metálico, náuseas, anorexia e diarreia. Segundo HERMANN (1979) e SCARPELLO et al (1998), a diarreia pode refletir um distúrbio na absorção de sais biliares. Distúrbios gastrintestinais, tais como a diarreia, são freqüentes e dessa forma, a absorção intestinal de vitamina B, especialmente o folato, é prejudicado durante terapia crônica. Esta deficiência pode levar ao aumento dos níveis de homocisteína que acelera a progressão das doenças vasculares. O aumento dos níveis de homocisteína é associado ao aumento de mortalidade de pacientes com doença cardiovascular aterogênica (FISMAN et al, 2004). Apesar da rápida excreção urinária com meia vida plasmática entre, 1,5 e 4,5 h (HOWLETT & BAILEY, 1999), há risco de acidose láctica (1 caso por 10.000 pacientes/ano). Por esta razão, esta droga não é recomendada a pacientes com deficiências hepáticas e renais.

1.5 GLIBENCLAMIDA

As sulfoniluréias vem sendo utilizadas para o tratamento do diabetes há mais de 50 anos. Atualmente, as sulfoniluréias continuam sendo a principal forma de tratamento de pacientes com diabetes tipo 2 (FISMAN et al, 2004).

A primeira sulfoniluréia utilizada foi a tolbutamida, que foi substituída pela glibenclamida e a gliburide. E atualmente existe uma nova geração de sulfoniluréia, a glimepiridina, que tem efeito mais específico no pâncreas (FISMAN et al, 2004).

A glibenclamida, é um antidiabético oral do grupo das sulfoniluréias, dotado de potente ação hipoglicemiante, sendo indicado no tratamento de alguns tipos de diabetes mellitus tipo 2. Sua fórmula estrutural é:

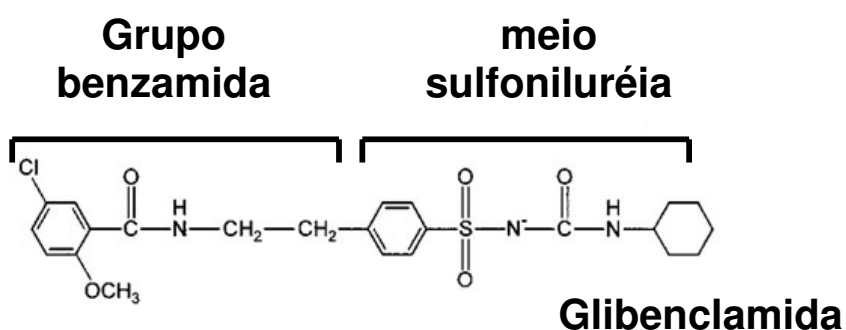


Figura 2: fórmula estrutural da glibenclamida

O modo de ação das sulfoniluréias envolve a sua ligação a receptores específicos (SUR₁) que é um dos principais componente dos canais de potássio sensíveis ao ATP nas células β (ASHCROFT & ASHCROFT, 1992). É através desta ligação que o efluxo de K⁺ é bloqueado pelas sulfoniluréias e, conseqüentemente, ocorre a despolarização da membrana plasmática que resulta na abertura de canais de Ca²⁺, sensíveis à voltagem. O influxo de Ca²⁺, por sua vez, estimula migração dos grânulos de insulina para a periferia e a sua fusão

com a membrana dá início a exocitose (FERRER et al, 1984; MEDA et al, 1984; EMILIEN et al, 1999).

Seu uso é recomendado a pacientes diabéticos do tipo não dependente de insulina que não respondem apenas à dieta e cujo pâncreas ainda conserva parcela de capacidade de produção e secreção de insulina (LARNER, 1983).

Canais de potássio sensíveis a ATP também são encontrados no sistema cardiovascular (NOMA, 1989). Já os receptores do miocárdio e do músculo vascular liso são diferentes do SUR₁ pancreático, e são caracterizados como SUR_{2a} e SUR_{2b}, respectivamente (CHUTKOW et al, 1996; ISOMOTO et al, 1995). A glibenclamida, porém, possui mais afinidade ao SUR₁ do que ao SUR_{2a} e SUR_{2b} (YOKOSHIKI et al, 1998), não sendo ainda conhecida a concentração de glibenclamida que possa afetar a função do sistema cardiovascular. Teoricamente, o bloqueio de canais de potássio sensíveis a ATP pode interferir no mecanismo cardioprotetor endógeno, especialmente durante uma isquemia, quando níveis reduzidos de ATP intracelular desencadeiam a abertura destes canais K⁺ (COETZEE, 1992; NOMA, 1989)

As sulfoniluréias também afetam o metabolismo energético miocardial, estimulando a glicogenólise, a captação e a utilização de glicose, bem como a diminuição do metabolismo de ácidos graxos livres. Estes efeitos são devidos à inibição da atividade da carnitina palmitil-transferase, uma enzima reguladora da oxidação dos ácidos graxos (SCHOTBORGH & WILDE, 1997).

A glibenclamida pode causar reações hipoglicêmicas, inclusive levando o paciente ao coma devido à redução dos níveis de glicose circulatória. Por outro lado, as sulfoniluréias são contra-indicadas em pacientes com insuficiência hepática e/ou renal em virtude do seu papel na eliminação do medicamento. Sulfoniluréias também pode causar intolerância ao álcool,

provocando náuseas, rubor e palpitações (LARNER, 1983). Além disso, o mecanismo pelo qual a glibenclamida atua, o bloqueio do canal de K^+ sensível a ATP (K_{ATP}), é considerado um aumento de riscos cardiovasculares (GARLID et al, 1997; QUAST et al, 2004).

Quanto à glicemia e Hb glicosilada a associação de metformina com glibenclamida possibilitou o aproveitamento de suas respectivas propriedades favoráveis e o seu emprego conjunto foi sugerido por diversos pesquisadores (BAILEY & TURNER, 1996; HERMANN, 1996; LEITER, 1996;; BAILEY, 2000) e inclusive o grupo UKPDS (1998) durante pesquisa de ampla abrangência.

A associação de metformina com glibenclamida promoveu a diminuição de 25 a 30 % da concentração da glicose plasmática e também diminuiu entre 16-27 %, a concentração de hemoglobina glicosilada (EMILIEN et al, 1999). Também foi observado que estes medicamentos produziram efeitos benéficos em doenças micro e macro-vasculares. Poderia esta combinação ser benéfica ao tratamento de diabéticos?

Todavia, os efeitos dos agentes anti-hiperglicêmicos orais sobre o sistema cardiovascular foi reavaliado recentemente. Estudos realizados pelo UKPDS Group (1998) revelaram maior risco de morte em diabéticos tratados com esta associação do que em grupos tratados por apenas uma das drogas. Esta associação também foi responsabilizada pelo aumento de risco de infarte do miocárdio (OLSSON et al, 2000). Isto provavelmente ocorra em virtude de ambos aumentarem os riscos cardiovasculares isoladamente e quando associados, os riscos são potencializados.

Capítulo

2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O propósito deste trabalho foi investigar os efeitos do tratamento com metformina e/ou de sua associação à glibenclamida em ratos diabéticos por aloxana sobre:

- 1) a força de contração e o relaxamento cardíaco, assim como, a pressão sistólica ventricular e a pressão desenvolvida em função do tempo (DP/Dt), sob isquemia induzida por noradrenalina;
- 2) o conteúdo de glicogênio do ventrículo após a perfusão com noradrenalina para avaliarmos os efeitos da isquemia, comparados com os correspondentes grupos não perfundidos;
- 3) as funções cardíacas, avaliados por parâmetros eletrocardiográficos;
- 4) os aspectos morfológicos do músculo ventricular cardíaco e as implicações sobre suas funções;

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados ratos, albinos, Wistar com idade de 10 semanas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP. Os ratos foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica, sendo adaptados durante duas semanas. Os ratos foram alimentados com ração (Purina para roedores) e água “ad libitum” em ciclo fotoperiódico de 12 h claro e 12 h escuro, a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. O Comitê de Ética em Experimentação Animal da Unicamp aprovou o protocolo experimental sob o número 262-1.

A metformina nas concentrações 5,6, 56 e 112 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e/ou a glibenclamida na concentração de 0,13 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ foi adicionada na água de beber. Posteriormente a ingestão hídrica foi medida e dividida pelo peso corporal dos ratos para avaliarmos a quantidade de medicamento ingerido (da SILVA, 2001).

Grupos:

- 1) Controle (não diabético) (C; n = 5)
 - 2) Diabetes (sem tratamento) (D; n = 6)
 - 3) Diabetes Metformina - [3,5 $\mu\text{g}.\text{g}^{-1}$ pc] (DM3,5; n = 8)
 - 4) Diabetes Metformina [30 $\mu\text{g}.\text{g}^{-1}$ pc] (DM 30; n = 7)
 - 5) Diabetes Metformina [74 $\mu\text{g}.\text{g}^{-1}$ pc] (DM 74; n = 8)
-
- 1) Diabetes Glibenclamida [0,10 $\mu\text{g}.\text{g}^{-1}$ pc] (DG; n = 6)
 - 2) Diabetes Metformina [3,5 $\mu\text{g}.\text{g}^{-1}$ pc] + Glibenclamida [0,10 $\mu\text{g}.\text{g}^{-1}$ pc] (DGM; n = 6)

3.2 Indução do Diabetes Mellitus

Antes que o diabetes mellitus fosse induzido, os ratos foram mantidos sob jejum de 24 horas, com livre acesso a água. Após serem anestesiados com pentobarbital sódico (40mg.kg^{-1} de peso corporal), os ratos receberam uma injeção de aloxana em salina (40mg.kg^{-1} de peso, i.v. pH 4,5) (SCHERER, 1955; STEINER et al., 1961). O estabelecimento do diabetes foi verificado através da presença de glicose na urina no dia seguinte.

Constatando o estado diabético, nos três dias seguintes, os ratos receberam subcutaneamente, 1 U (unidade) de insulina de longa duração (Neosulin N, NPH suína, monocomponente) para diminuir a mortalidade causada pelos efeitos da aloxana.

3.3 Eletrocardiograma

Uma das formas de avaliar os efeitos do diabetes por aloxana sobre a função cardíaca foi comparar os registros do eletrocardiograma (ECG) em ratos anestesiados.

Os ratos foram anestesiados (pentobarbital sódico, 40mg.kg^{-1} de peso corporal) e mantido na posição supina sob respiração espontânea. Embora diferentes agentes anestésicos produzam efeitos sobre os registros eletrocardiográficos, os barbitúricos não produzem efeitos cardiovasculares significativos sob doses hipnóticas (KUMAR et al, 1995).

As ondas do ECG foram registradas por um aparelho eletrocardiográfico (Heart Ware System) através de eletrodos conectados por meio de agulhas hipodérmicas às patas do rato. Os registros obtidos através das derivadas (D1, D2, D3, aVR, aVL e aVF) foram utilizados para calcular a frequência cardíaca, para mediar a intensidade e os intervalos entre as ondas e o estabelecimentos do eixo cardíaco. O intervalo QT foi corrigido pela fórmula de Bazzer's (SGOIFO et al., 1996):

$$QTc = \frac{Q-T}{\sqrt{R-R}}$$

A dispersão do QT e do QTc foi calculada em valores absolutos, subtraindo o intervalo QT mais curto do intervalo QT mais longo. Este valor foi convertido a um percentual (%QTd) usando a fórmula ($\%QTd = [QT_{max} - QT_{min}/QT_{min}] \times 100$). A mesma operação foi usada para calcular o QTcd.

3.4 Coração Isolado de Rato pelo Método de Langendorff

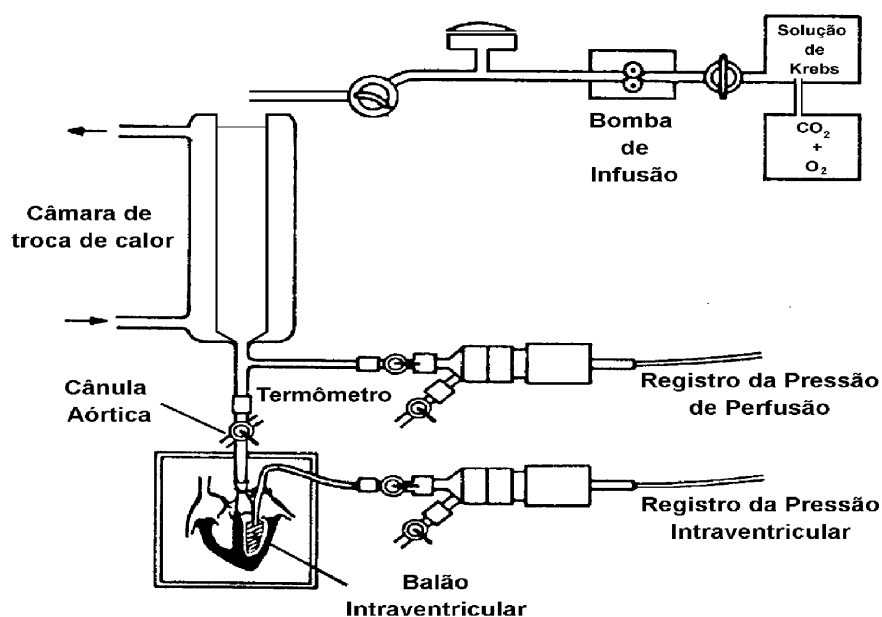
Outra forma de avaliar a função cardíaca foi estudar a atividade de coração isolado, perfundido com solução fisiológica, sob pressão constante através de uma cânula inserida no ventrículo esquerdo, método desenvolvido por Langendorff.

O princípio deste método consiste em perfundir o coração através de um sistema de pressão de perfusão, conectado a uma cânula inserida na aorta. Neste sistema, a pressão de perfusão adequada para ratos varia de 60 a 70 mmHg e a frequência não deve ser inferior a 200 batimentos por minutos. Para perfusão do coração isolado foi utilizada a solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição em (mM): NaCl 188, NaHCO₃ 25, glicose 11,1, KCl 4,7, KH₂PO₄ 1,2, MgSO₄·7H₂O 1,17 e CaCl₂·2H₂O 2,5 continuamente aerada com O₂:CO₂ (95:5%). Através deste método foi possível induzir uma isquemia e avaliar seus efeitos sobre a força de contração e sobre o glicogênio restante no músculo cardíaco.

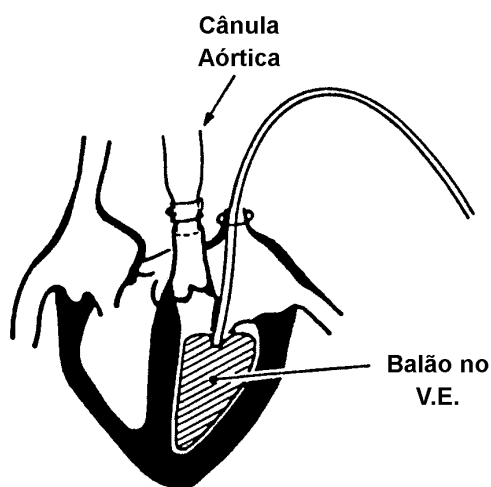
3.5 Procedimentos Cirúrgicos

Todos os processos cirúrgicos foram realizados em ratos anestesiados para os estudos usando o método de Langendorff. Após anestesia, os animais foram submetidos à toracotomia e o coração foi rapidamente removido com aproximadamente 1 cm da aorta e montados no sistema de perfusão Langendorff. A perfusão foi realizada sob pressão constante de 65 mmHg, a 37° C. Através de uma pequena incisão no átrio esquerdo, um

balão de látex acoplado a uma cânula (PE 160) foi introduzido cruzando o orifício mitral até atingir o ventrículo esquerdo. Esta cânula foi acoplada ao transdutor de pressão (Ugo Basile), e os registros de pressão e frequência cardíaca foram amplificados. A pressão diastólica inicial foi estabelecida entre 0 e 10 mmHg



Esquema de perfusão de coração sob pressão constante pelo método de Langendorff. Adaptado: Döring & Dehnert. The isolated perfused heart. Germany, Biomesstechnik-Verlag, 1988.



Esquema do coração isolado de rato com o balão inserido na cavidade ventricular. Adaptado: Döring & Dehnert (1988).

3.6 Protocolo de Perfusão - Isquemia

Nos grupos submetidos à isquemia, após 10 min. de perfusão normal (solução fisiológica de Krebs), cada coração foi perfundido durante 60 minutos em solução de Krebs contendo noradrenalina 10^{-6} M através de uma bomba de perfusão regulada em $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. Concluída a perfusão, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido para subsequente medida de substratos.

3.7 Determinação do Glicogênio

As amostras de ventrículo (200 mg) foram digeridas em KOH 30% a quente e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol a quente. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada (3000 rpm durante 15 min). O glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol (LO et al., 1970). A concentração de glicogênio ($\text{mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ de peso úmido) foi determinada pela leitura da absorbância a 490 nm, em espectrofotômetro.

3.8 Determinação da Glicose no Plasma

As amostras de sangue (i.v) foram retiradas após anestesia. O sangue foi centrifugado e o plasma separado. Alíquotas de plasma foram utilizadas para a determinação da glicose. A glicose foi determinada pelo método da glicose oxidase (TRINDER, 1969).

3.9 Histologia

Os corações utilizados nos estudos histológicos foram retirados de ratos sob anestesia e imediatamente colocados em solução salina (e perfundidos sob leve pressão) com a finalidade de lavar o sangue presente no interior do coração. Após pesagem, foram

colocados em frascos contendo formol 10% por 72 horas. Em seguida cada coração foi lavado sucessivamente em solução contendo tampão fosfato e salina.

A seguir, foi iniciada a desidratação com álcool 70% durante 16 h. Após esta passagem, segue-se a desidratação com álcool 80% (1 hora), álcool 95% (1 h), 4 passagens por álcool 100% (30 min cada passagem), e a seguir álcool 100% + xilol (1:1) por 30 min, xilol (20 min), xilol + parafina (1:1) por 30 min. em estufa.

Terminado este período, foi transferido para uma fôrma contendo apenas parafina, permanecendo na estufa por 3 horas.

Após resfriado, cada bloco foi retirado das fôrmas e o excesso de parafina foi removido.

Os cortes foram realizados em micrótomo e fixados em lâminas com albumina.

3.10 Corantes Histológicos

Após fixação em laminas os cortes foram coloridos pelos métodos de hematoxilina eosina (HE) e pelo Ácido de Schiff.

O número e a área dos núcleos, bem como, a presença de grânulos de glicogênio foram observados e gravados utilizando o software Image Pro Plus após imagem obtida no microscópio Leica (100 x).

3.11 Análise Estatística

Quando adequada, a avaliação dos dados foi feita através da análise de variância por dois fatores, seguida do teste de TUKEY quando necessário. Foram considerados significativos os valores cujas diferenças foram demonstradas menores que 5%.

Capítulo

4

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos do Diabetes

Inicialmente caracterizamos o modelo diabético, avaliando as principais diferenças em relação ao grupo controle. Nos ratos diabéticos por aloxana a glicemia aumentou de $97.76 \pm 10.6 \text{ mg.dl}^{-1}$ para $562.8 \pm 60.6 \text{ mg.dl}^{-1}$ ($p < 0.001$; fig. 3).

Quanto aos registros eletrocardiográficos, as figuras 2 A-D não mostram diferenças quanto aos intervalos QT e suas derivadas: QTc, QTd e QTcd ao iniciar os experimentos nos grupos controle e diabéticos. Após 15 dias, os registros revelaram um aumento nos intervalos: QTc variou de $45.7 \pm 2.26 \text{ ms}$ para $53.2 \pm 3.24 \text{ ms}$ ($p < 0.05$). Suas derivadas aumentaram significativamente, também, o QTd variou de $9.68 \pm 2.1 \text{ ms}$ para $58.12 \pm 5.1 \text{ ms}$ ($p < 0.001$) e o QTcd variou de $15.7 \pm 3.1 \text{ ms}$ para $86.9 \pm 4.4 \text{ ms}$ ($p < 0.001$). Após 30 dias, estes parâmetros aumentaram novamente: o QT passou de $39.8 \pm 0.7 \text{ ms}$ para $47.5 \pm 1.6 \text{ ms}$ ($p < 0.05$), o QTc passou de $45.7 \pm 2.26 \text{ ms}$ para $63.1 \pm 1.31 \text{ ms}$ ($p < 0.001$), o QTd passou de $9.68 \pm 2.1 \text{ ms}$ para $75.5 \pm 7.1 \text{ ms}$ ($p < 0.001$) e o QTcd passou de $15.7 \pm 3.1 \text{ ms}$ para $86.3 \pm 8.4 \text{ ms}$ ($p < 0.001$). O grupo controle não apresentou modificações significativas no mesmo período, (figs. 4 A – D).

A fig. 5 também mostra aumento do conteúdo de glicogênio no músculo cardíaco em ratos diabéticos, de $0,19 \pm 0,007 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ para $0,38 \pm 0,07 \text{ mg.100 mg}^{-1}$. A análise morfológica também evidencia este aumento (figs. 6 e 7).

A outra etapa experimental foi avaliar a resposta cardíaca dos corações isolados (fig. 11 A – C), demonstrando maior susceptibilidade aos efeitos da isquemia.

A fig. 11 A, mostra que o coração de ratos diabéticos desenvolveu menor pressão sistólica ventricular basal ($48 \pm 3,6 \text{ mmHg}$) em comparação ao grupo controle ($70 \pm 7,5$

mmHg). Os picos de pressão sistólica e a pressão mantida durante o restante da perfusão também foram menores. Após 5 min. de perfusão com noradrenalina, o coração de ratos diabéticos desenvolveu menor pico de pressão sistólica ventricular ($96 \pm 8,1$) em relação ao controle ($145 \pm 9,7$ mmHg). Ao término do período de perfusão (1 hora) a pressão sistólica ventricular foi restabelecida em cada um dos grupos. Entretanto, permaneceu a diferença entre as pressões registradas nos grupos controle e diabetes (99 ± 3 e $65 \pm 5,8$ mmHg, respectivamente).

O mesmo foi observado com as respectivas derivadas, DP/Dt^+ e DP/Dt^- (fig. 11 B e C respectivamente).

Após a perfusão com noradrenalina, o glicogênio remanescente no coração dos ratos diabéticos foi medido, não diferindo do grupo controle ($0,1 \pm 0,007$ mg.100 mg⁻¹ vs $0,11 \pm 0,01$ mg.100 mg⁻¹; fig. 12). Todavia, os ratos diabéticos utilizaram maior quantidade do glicogênio ventricular em relação ao inicial (70% vs 51% do grupo controle).

A análise morfológica do coração mostrou que os ratos diabéticos aumentaram a quantidade de núcleos de $21,33 \pm 1,17$ para $36,6 \pm 5$ enquanto reduziram sua área, de $0,16 \pm 0,02$ μm² para $0,08 \pm 0,01$ μm² quando comparado aos ratos do grupo controle (figs. 13 - 16).

4.2 Efeitos do Tratamento com Metformina

Após 15 dias, desde a indução do diabetes pela injeção de aloxana, a glicemia aumentou em todos os grupos, tratados ou não por metformina. No grupo de ratos diabéticos tratados pela dose mais baixa de metformina, a glicemia variou de 122.7 ± 4.41 mg.dl⁻¹ para 381.32 ± 36.6 mg.dl⁻¹ ($p < 0.001$) e nos grupos tratados pela dose intermediária, variou de 102.71 ± 3.96 mg.dl⁻¹ para 360.85 ± 13.56 mg.dl⁻¹ ($p < 0.001$; fig. 3). Após 30 dias do início do

tratamento, a glicemia não modificou, mas foi inferior ao grupo de diabéticos não tratados (fig. 3).

Ao contrário, a dose mais alta de metformina ($74 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.c), não foi eficiente para diminuir a glicemia após 15 ou 30 dias de tratamento. Durante o primeiro período, a glicemia variou de $102.16 \pm 1.42 \text{ mg.dl}^{-1}$ para $542.8 \pm 24.45 \text{ mg.dl}^{-1}$ ($p < 0.001$) e após 30 dias foi de $470.27 \pm 26.7 \text{ mg.dl}^{-1}$ ($p < 0.001$; fig. 3), não sendo diferente do grupo diabético não tratado.

Quanto aos registros eletrocardiográficos, não foram evidenciadas diferenças significativas nos registros iniciais em todos os grupos, tratados ou não com metformina (Figs 4 A-D). Após 15 dias de terapia, usando baixas doses de metformina ($3.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ pc), a derivada QTd aumentou de $16.6 \pm 1.07 \text{ ms}$ para $42.0 \pm 2.3 \text{ ms}$ ($p < 0.01$) e QTcd aumentou de $19.4 \pm 2.7 \text{ ms}$ to $40.4 \pm 5.0 \text{ ms}$ ($p < 0.01$). Após 30 dias de tratamento, o intervalo QT aumentou de $35.7 \pm 1.25 \text{ ms}$ para $45.15 \pm 1.56 \text{ ms}$ ($p < 0.05$), enquanto as suas derivadas QTc, QTd e QTcd não foram modificadas desde o 15^o dia (figs 4 A - D).

Similarmente, o grupo tratado durante 15 dias por doses intermediárias de metformina apresentou aumento do QTd de $19.0 \pm 2.32 \text{ ms}$ para $48.8 \pm 3.06 \text{ ms}$ ($p < 0.01$) e o intervalo QTcd também aumentou de $19.9 \pm 2.9 \text{ ms}$ para $44.0 \pm 2.6 \text{ ms}$ ($p < 0.01$). Após o 15^o dia, estes parâmetros não sofreram mais modificações.

Entretanto, os grupos tratados durante 15 dias com a mais alta dose de metformina ($74 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.c.) tiveram aumento nos intervalos QT, passando de $44.0 \pm 1.53 \text{ ms}$ para $52.9 \pm 1.17 \text{ ms}$ ($p < 0.05$). Modificações similares foram detectadas em suas respectivas derivadas: QTc aumentou de $42.0 \pm 2.04 \text{ ms}$ para $53.4 \pm 2.5 \text{ ms}$ ($p < 0.05$); QTd variou de $16.4 \pm 2.7 \text{ ms}$ para $36.5 \pm 3.2 \text{ ms}$ ($p < 0.05$) e o QTcd, de $16.1 \pm 2.15 \text{ ms}$ para $47.9 \pm 2.67 \text{ ms}$ ($p < 0.001$). Entretanto, no 30^o dia de tratamento, o QTd ainda aumentou para $74.5 \pm 4.4 \text{ ms}$ ($p < 0.001$) e

o QTcd mudou para 71.9 ± 5.2 ms ($p < 0.001$) valores muito próximos do grupo diabético não tratado (figs 4 A-D).

A figura 5 mostra que o tratamento de ratos diabéticos com metformina aumentou a concentração de glicogênio em todos os grupos. Entretanto, no grupo tratado com baixas doses de metformina, este aumento foi menor ($0,36 \pm 0,02$ mg.100 mg⁻¹) quando comparado aos grupos tratados com maiores doses de metformina ($0,50 \pm 0,05$ mg.100 mg⁻¹ e $0,67 \pm 0,045$ mg.100 mg⁻¹, respectivamente). Este aumento foi também evidenciado nas análises morfológicas (figs 8-10)

Corações isolados de ratos diabéticos tratados com metformina em concentrações baixa e intermediária, quando submetidos à isquemia, foram mais protegidos contra os seus efeitos do que aqueles tratados com a concentração mais alta (fig. 11 A - C).

A fig. 11 A mostra que os corações isolados de ratos diabéticos tratados com metformina em concentrações baixa e intermediária desenvolveram maior pressão sistólica ventricular basal (97 ± 6 mmHg e 81 ± 14 mmHg, respectivamente) do que o grupo de ratos diabéticos sem tratamento ($53 \pm 4,5$ mmHg). Todavia, o coração de ratos tratados com a mais alta concentração de metformina desenvolveu pressão mais baixa (66 ± 8 mmHg) que aquela dos outros grupos tratados, não diferindo do grupo sem tratamento.

Após a perfusão com noradrenalina, o coração de ratos diabéticos tratados com metformina em concentrações baixa e intermediária desenvolveu pico de pressão sistólica ventricular bem maior (150 ± 5 mmHg e 174 ± 6 mmHg, respectivamente) que a do grupo não tratado ($96 \pm 8,1$ mmHg). Os ratos tratados com a maior concentração de metformina desenvolveram menor pressão sistólica ventricular (112 ± 5 mmHg), não diferindo do grupo não tratado. Ao término do período de perfusão, a pressão sistólica

ventricular foi restabelecida em todos os grupos, porém as diferenças entre as pressões registradas permaneceram (91 ± 6 mmHg; 102 ± 2 mmHg; 80 ± 10 mmHg).

O mesmo padrão foi observado nas curvas correspondentes às derivadas DP/Dt^+ e DP/Dt^- (fig 11 B e C).

A perfusão dos corações isolados de ratos diabéticos na presença de noradrenalina, promoveu grande depleção do conteúdo de glicogênio. Entretanto o grupo tratado com altas concentrações de metformina ($74 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.c) apresentou maior depleção, sendo reduzida de $0,67 \pm 0,045 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ para $0,06 \pm 0,045 \text{ mg.100 mg}^{-1}$. Os tratados com dose intermediária ($30 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.c) tiveram redução de $0,50 \pm 0,05 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ para $0,1 \pm 0,006 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ enquanto que o grupo tratado com a menor dose ($3,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.c) reduziu de $0,36 \pm 0,02 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ para $0,08 \pm 0,01 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ (fig. 5 e 12).

Quanto à análise morfológica, o grupo tratado com a menor dose de metformina ($3,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ pc) apresentou uma redução na quantidade de núcleos (de $36,6 \pm 5$ para $22,8 \pm 2$, $p < 0,05$) e aumentou o seu tamanho de $0,08 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ para $0,17 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$, ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo diabético não tratado. O grupo tratado com a menor dose de metformina não diferiu do controle (fig. 13, 14 e 17).

As doses intermediárias ($30 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.c) e altas ($74 \mu\text{g.g}^{-1}$ p.c) de metformina promoveram aumento da quantidade de núcleos, de $21,33 \pm 1,17$ (no controle) para $34,16 \pm 1,85$ e $47,29 \pm 2,92$ ($p < 0,05$), respectivamente. Além disso, a área dos núcleos aumentou de $0,16 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$ para $0,86 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$ e $0,5 \pm 0,06 \mu\text{m}^2$, respectivamente, ambos diferindo dos grupos controle e do diabético não tratados ($p < 0,05$; figs 13 – 16, 18 e 19).

4.3 Efeitos do Tratamento com Glibenclamida

Após 15 dias, desde a indução do diabetes pela injeção de aloxana, a glicemia aumentou em todos os grupos, tratados ou não por glibenclamida. No grupo de ratos diabéticos tratados com glibenclamida, a glicemia variou de $104.5 \pm 3,5 \text{ mg.dl}^{-1}$ para $528 \pm 28,1 \text{ mg.dl}^{-1}$ ($p < 0.001$; fig. 20). Entretanto, após 30 dias de tratamento, a glicemia diminuiu para $404 \pm 10,8 \text{ mg.dl}^{-1}$, sendo inferior ao grupo de diabéticos não tratados (fig. 20).

Quanto aos registros eletrocardiográficos, o tratamento com glibenclamida, não aumentou o intervalo QT em ratos diabéticos após 15 dias (de $41,33 \pm 2,97 \text{ ms}$ para $43,6 \pm 2,24 \text{ ms}$) ou após 30 dias ($40,76 \pm 1,29 \text{ ms}$). Estes resultados são semelhantes aos do grupo controle ao final do experimento. Entretanto, o intervalo QTc após 15 dias, aumentou de $57,4 \pm 0,76 \text{ ms}$ para $76,9 \pm 4,3 \text{ ms}$, $p < 0,05$ e para $66,6 \pm 4,4 \text{ ms}$ ($p < 0,05$) após 30 dias (fig. 21 A - D). Similarmente, houve aumento dos intervalos QTd, que foi de $10.9 \pm 1,5 \text{ ms}$ para $58.9 \pm 3.2 \text{ ms}$ ($p < 0,001$) e QTcd, de $11.8 \pm 1,8 \text{ ms}$ para $72,4 \pm 3,4 \text{ ms}$ ($p < 0,001$) ao término do experimento (figs. 21 A - D).

As figs. 22 e 23 mostram que o tratamento de ratos diabéticos com glibenclamida induziu aumento na concentração de glicogênio no músculo cardíaco, de $0,19 \pm 0,007 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ para $0,62 \pm 0,05 \text{ mg.100 mg}^{-1}$ ($p < 0,001$).

Os corações isolados de ratos diabéticos tratados com glibenclamida (fig. 25 A) desenvolveram maior pressão sistólica ventricular basal ($90 \pm 5,8 \text{ mmHg}$) do que o grupo diabético sem tratamento ($53 \pm 4,5 \text{ mmHg}$).

No início da perfusão com noradrenalina, o coração de ratos diabéticos, tratados com glibenclamida, desenvolveu maior pico de pressão sistólica ventricular ($158 \pm 6,8 \text{ mmHg}$) do que o grupo não tratado ($96 \pm 8,1 \text{ mmHg}$). Ao término do período de perfusão, a pressão

sistólica ventricular foi restabelecida a valores basais, permanecendo, todavia, mais elevada do que a do grupo diabético ($90 \pm 7,8$ mmHg vs $65 \pm 5,80$ mmHg; Fig 25 A). O mesmo foi demonstrado nas curvas correspondentes às respectivas DP/Dt^+ e DP/Dt^- (fig 25 B - C).

A perfusão dos corações isolados de ratos diabéticos na presença de noradrenalina, resultou em grande depleção do conteúdo de glicogênio (figs. 22 e 26). Entretanto, o grupo diabético tratado com glibenclamida teve menor depleção de glicogênio, diminuindo de $0,62 \pm 0,05$ mg.100 mg⁻¹ para $0,19 \pm 0,05$ mg.100 mg⁻¹.

Quanto à análise morfológica, o grupo tratado com glibenclamida não diferiu em relação à quantidade de núcleos do grupo diabético ($36,6 \pm 5$ vs $38,4 \pm 2,16$; $p > 0,05$). Entretanto, aumentou em relação ao grupo controle (de $21,33 \pm 1,17$ para $38,4 \pm 2,16$). Quanto ao tamanho dos núcleos, estes aumentaram em comparação ao grupo diabético não tratado (de $0,08 \pm 0,01$ μm^2 para $0,71 \pm 0,09$ μm^2 , $p < 0,001$) e quando comparado ao grupo controle (de $21,33 \pm 1,17$ μm^2 para $38,4 \pm 2,16$ μm^2 , $p < 0,001$; fig. 27-29).

4.3 Efeitos da Associação Metformina ($3,5 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ pc}$) e Glibenclamida no Tratamento de Ratos Diabéticos

Após 15 dias, aloxana promoveu um aumento da glicemia nos grupos diabéticos. O grupo tratado com metformina apresentou aumento da glicemia de $122,7 \pm 4,4 \text{ mg.dl}^{-1}$ para $381 \pm 36,6 \text{ mg.dl}^{-1}$ ($p < 0,001$), assim como o grupo tratado com glibenclamida, apresentou aumento de $104,5 \pm 3,5 \text{ mg.dl}^{-1}$ para $528 \pm 28,1 \text{ mg.dl}^{-1}$ ($p < 0,001$). O grupo tratado com a associação metformina/glibenclamida também apresentou aumento da glicemia (de $108,7 \pm 3,8 \text{ mg.dl}^{-1}$ para $536 \pm 23,8 \text{ mg.dl}^{-1}$, $p < 0,001$; fig. 20).

Entretanto, durante 30 dias de tratamento, a glicemia se manteve no grupo tratado com metformina ($347 \pm 31,4 \text{ mg.dl}^{-1}$), enquanto nos grupos tratados com glibenclamida ou glibenclamida associado a metformina houve diminuição da glicemia para $404 \pm 10,8 \text{ mg.dl}^{-1}$ e $400 \pm 19 \text{ mg.dl}^{-1}$, respectivamente. Estes valores foram também menores do que aquele apresentado pelo grupo diabético não tratado ($563 \pm 23,8 \text{ mg.dl}^{-1}$; fig. 20).

No início do tratamento, os registros eletrocardiográficos não revelaram diferenças quanto ao intervalo QT. Após 15 dias não houve aumento do intervalo QT no grupo tratado com glibenclamida (de $41,33 \pm 2,97 \text{ ms}$ para $43,6 \pm 2,24 \text{ ms}$), assim como, no grupo tratado com metformina (de $35,75 \pm 1,25 \text{ ms}$ para $37,02 \pm 1,32 \text{ ms}$). Entretanto, a associação metformina/glibenclamida promoveu aumento do intervalo QT de $37,75 \pm 0,62 \text{ ms}$ para $46,51 \pm 2,89 \text{ ms}$ ($p < 0,05$). Após 30 dias não houve alterações no grupo tratado com glibenclamida ($40,76 \pm 1,29 \text{ ms}$), porém o grupo tratado com metformina apresentou aumento do intervalo QT para $45,15 \pm 1,56 \text{ ms}$ ($p < 0,05$) enquanto o grupo tratado com a associação reduziu este intervalo para $42,28 \pm 1,79 \text{ ms}$ (fig. 21 A - D).

O tratamento com glibenclamida aumentou a derivada QTd de $10.9 \pm 1,5$ ms para 58.9 ± 3.2 ms ($p < 0,001$). O mesmo aconteceu com sua associação a metformina, aumentando de $9 \pm 2,3$ ms para $70,2 \pm 4,1$ ms ($p < 0,001$; fig. 21 C). O tratamento com metformina isoladamente também aumentou este intervalo de $16,6 \pm 1,07$ ms para $42 \pm 2,3$ ms ($p < 0,001$) após 15 dias de tratamento. Entretanto, este aumento não variou após 30 dias de tratamento ($43,3 \pm 5,26$ ms), sendo menor quando comparado ao grupo diabético ($75,5 \pm 7,10$ ms, $p < 0,001$) ou aos grupos tratados com glibenclamida.

Os ratos tratados com metformina, glibenclamida ou glibenclamida associado a metformina, diferiram quanto à duração do intervalo QTc (fig 21 B). Enquanto, o grupo tratado com metformina não apresentou alterações neste intervalo, nos grupos tratados com glibenclamida e glibenclamida associado a metformina houve aumento deste intervalo, variando de $57,4 \pm 0,76$ ms para $66,6 \pm 4,4$ ms e de $46,73 \pm 0,4$ ms para $74,5 \pm 4,01$ ms, respectivamente ($p < 0,05$).

Ao medirmos o intervalo QTcd, novamente houve aumento dos grupos tratados com glibenclamida e/ ou metformina (fig 21 D). O grupo tratado durante 15 dias com metformina apresentou aumento do QTcd de $19,42 \pm 2,69$ ms para $40,42 \pm 5$ ms ($p < 0,05$) que se manteve 30 dias após ($37,8 \pm 3,29$ ms). Entretanto, este aumento foi inferior ao apresentado pelo grupo diabético não tratado ($86,3 \pm 8,41$ ms, $p < 0,001$). Por outro lado, os grupos tratados com glibenclamida ou glibenclamida associado a metformina apresentaram aumento do QTcd após 15 ou 30 dias (fig 21 D).

As figs. 22 - 24 mostram que o tratamento de ratos diabéticos com metformina promoveu aumento do glicogênio armazenado no ventrículo (de $0,19 \pm 0,007$ mg.100 mg⁻¹ para $0,39 \pm 0,02$ mg.100 mg⁻¹, $p < 0,001$). Entretanto o tratamento com glibenclamida ou

glibenclamida associada a metformina promoveu um aumento maior ainda ($0,62 \pm 0,05$ mg.100 mg⁻¹ e $0,74 \pm 0,03$ mg.100 mg⁻¹, respectivamente; $p < 0,001$).

A fig. 25 A mostra que os corações isolados de ratos diabéticos tratados com glibenclamida e/ou metformina desenvolveram pressão sistólica ventricular basal semelhante.

Após a perfusão com noradrenalina, o coração de ratos diabéticos tratados com glibenclamida e/ou metformina desenvolveu pico de pressão sistólica ventricular também semelhante, ($158 \pm 6,8$ mmHg, 150 ± 5 mmHg e 154 ± 9 mmHg, respectivamente) e diferiram do grupo diabético não tratado ($96 \pm 8,1$ mmHg, $p < 0,001$). Ao término do período de perfusão, a pressão sistólica ventricular foi restabelecida a valores basais, entretanto, todos os grupos apresentaram pressão mais alta que o grupo diabético (fig. 25 A).

O mesmo foi demonstrado nas curvas correspondentes ao DP/Dt^+ e DP/Dt^- (figs. 25 B e C, respectivamente).

A perfusão dos corações isolados de ratos diabéticos na presença de noradrenalina, promoveu grande depleção do conteúdo de glicogênio em todos os grupos como pode ser mostrado pelas figs 22 e 26. Entretanto, apesar do glicogênio remanescente ter sido maior nos grupos tratados com glibenclamida (de $0,62 \pm 0,05$ mg.100 mg⁻¹ para $0,19 \pm 0,05$ mg.100 mg⁻¹) e glibenclamida associada a metformina (de $0,74 \pm 0,03$ mg.100 mg⁻¹ para $0,22 \pm 0,008$ mg.100 mg⁻¹) do que no grupo tratado com metformina isoladamente (de $0,36 \pm 0,02$ mg.100 mg⁻¹ para $0,08 \pm 0,01$ mg.100 mg⁻¹), a proporção utilizada foi semelhante, ou seja, em torno de 70 % do glicogênio armazenado foi utilizado por todos os grupos.

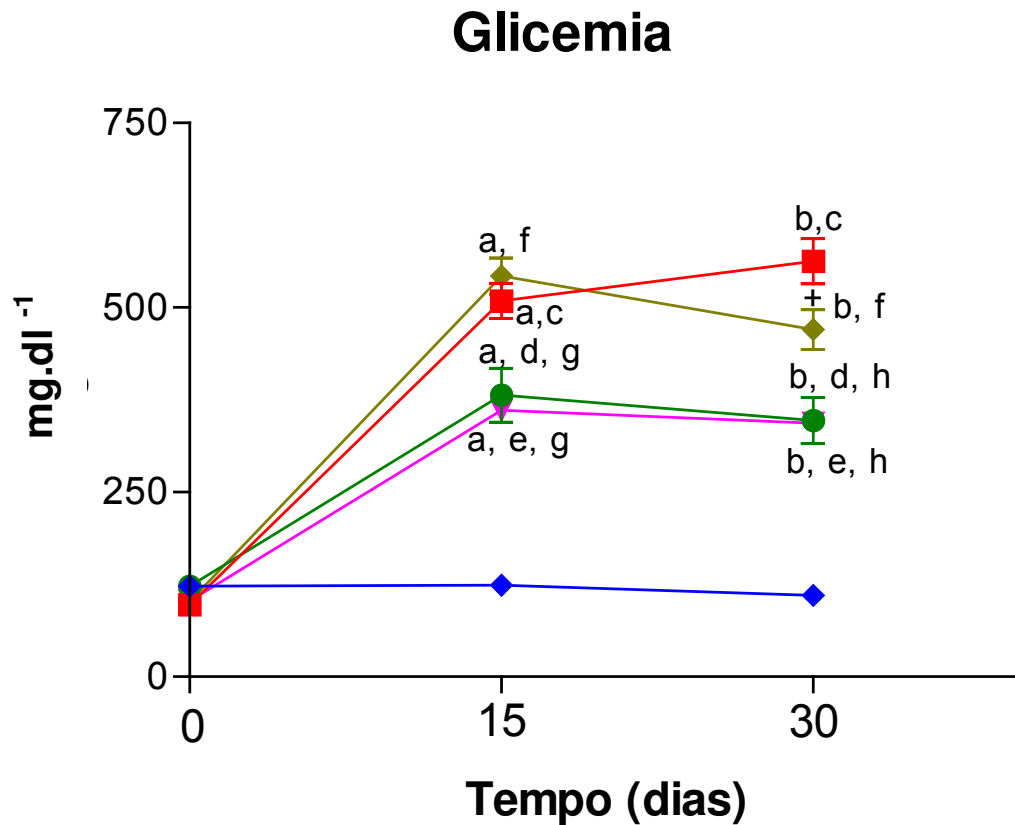
Quanto à análise morfológica, não houve diferenças entre os grupos tratados com glibenclamida em relação à quantidade de núcleos quando comparados ao grupo diabético.

Entretanto, o grupo tratado com metformina isoladamente apresentou redução na quantidade de núcleos, não diferindo do grupo controle ($C = 21,33 \pm 1,17$ e $DM = 22,8 \pm 2$; fig. 27).

Além de aumentar o número de núcleos, os grupos tratados com glibenclamida, bem como, a sua associação a metformina induziram aumento no tamanho do núcleo em relação ao grupo controle (de $0,16 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$ para $0,71 \pm 0,09 \mu\text{m}^2$ e $0,67 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$, respectivamente, $p < 0,001$) e em relação ao grupo diabético não tratado ($0,08 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Entretanto, o grupo tratado apenas com metformina não diferiu do grupo controle (fig. 28).

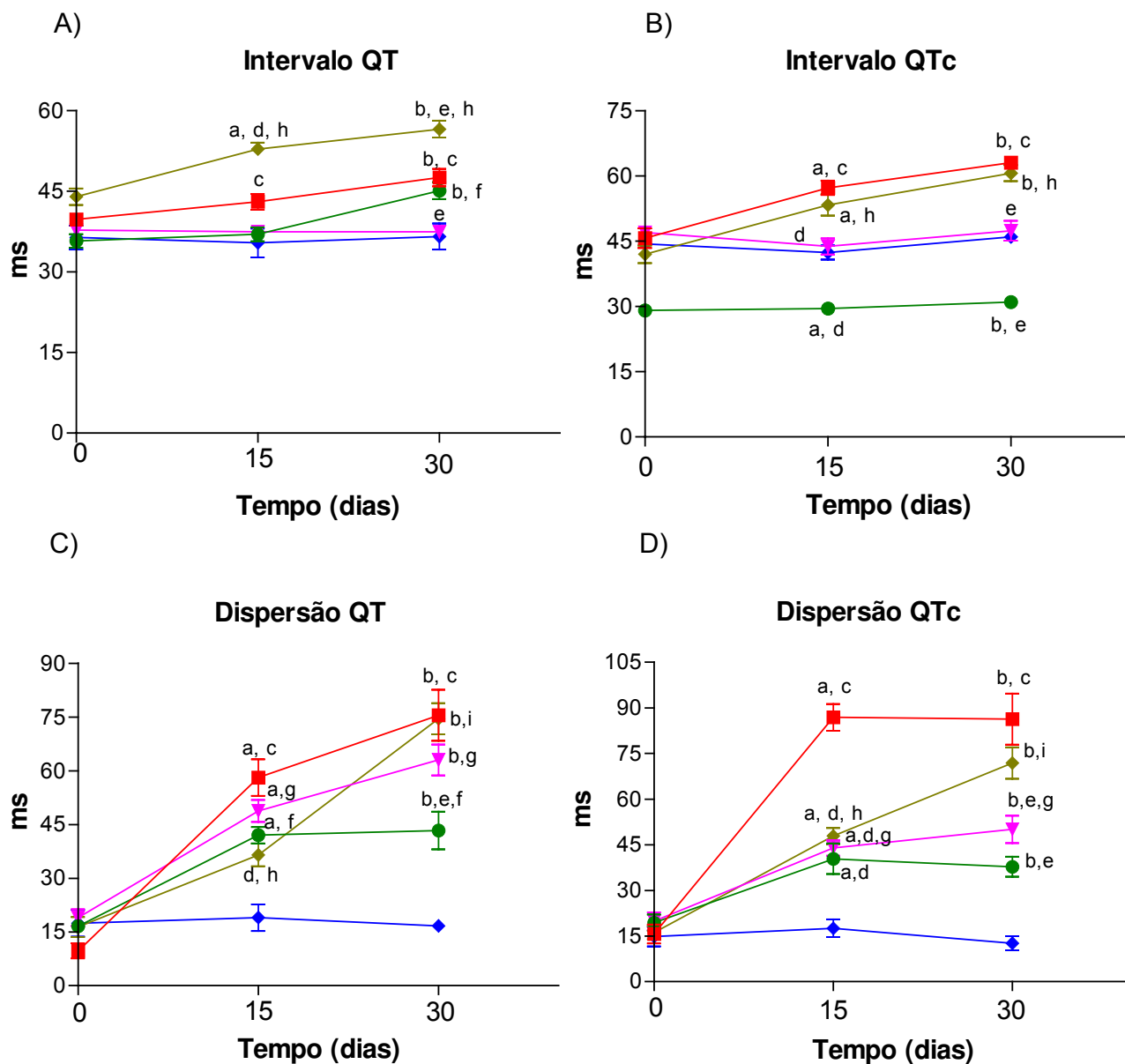
4.4 Figuras

Figura 3: Concentração plasmática de glicose (mg.dl^{-1}) de ratos após indução de diabetes por aloxana e após 15 e 30 dias de tratamento com metformina.



a: $p < 0.05$ vs controle-15 dias (—◆—); b: $p < 0.05$ vs controle-30 dias (—◆—); c: $p < 0.05$ vs diabetes-0 (—■—); d: $p < 0.05$ vs DM-3.5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pc-0 (—●—); e: $p < 0.05$ vs DM-30 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pc-0 (—▼—); f: $p < 0.05$ vs DM-74 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pc-0 (—◆—); g: $p < 0.05$ vs diabetes-15 dias; h: $p < 0.05$ vs diabetes-30 dias.

Figura 4 A, B, C, D: Mudanças nos intervalos QT, QTc, QTd e QTcd após 15 e 30 dias de tratamento com metformina.



a: $p < 0.05$ vs controle-15 dias (—◆—); b: $p < 0.05$ vs controle-30 dias (—◆—); c: $p < 0.05$ vs diabetes-0 (—■—); d: $p < 0.05$ vs diabetes-15 dias (—■—); e: $p < 0.05$ vs diabetes 30-dias (—■—); f: $p < 0.05$ vs DM-3.5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pc-0 (—●—); g: $p < 0.05$ vs DM-30 $\mu\text{g.g}^{-1}$ p.c – 0 (—▼—); h: $p < 0.05$ vs DM-74 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pc –0 (—◆—); i: $p < 0.05$ vs DM 74 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pc -15 dias (—◆—).

Figura 5: Mudanças no armazenamento de glicogênio ($\text{mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$) do coração não perfundido após indução de diabetes por aloxana e após tratamento com metformina por 30 dias. “a” $p < 0.05$ vs controle (C); “b” $p < 0.05$ vs diabetes (D); “c” $p < 0.05$ vs diabetes metformina $3,5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ pc; “d” $p < 0.05$ vs diabetes metformina $30 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ pc.

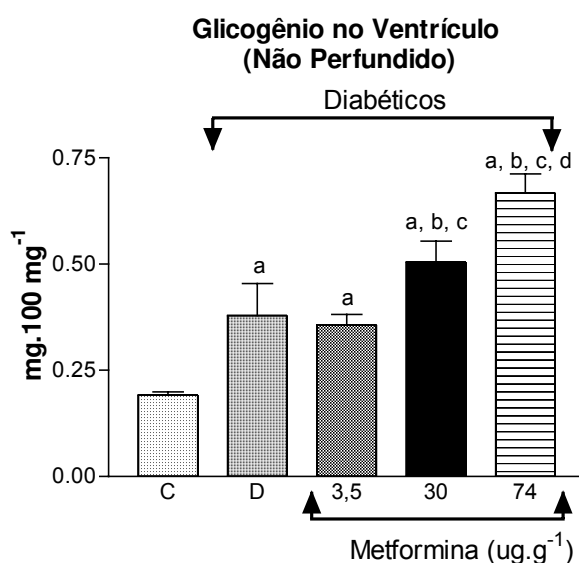


Figura 6) Regiões do ventrículo de ratos não diabéticos (controle). Ampliações mostram detalhes dos grânulos de glicogênio evidenciado pelo método de Schiff (PAS).

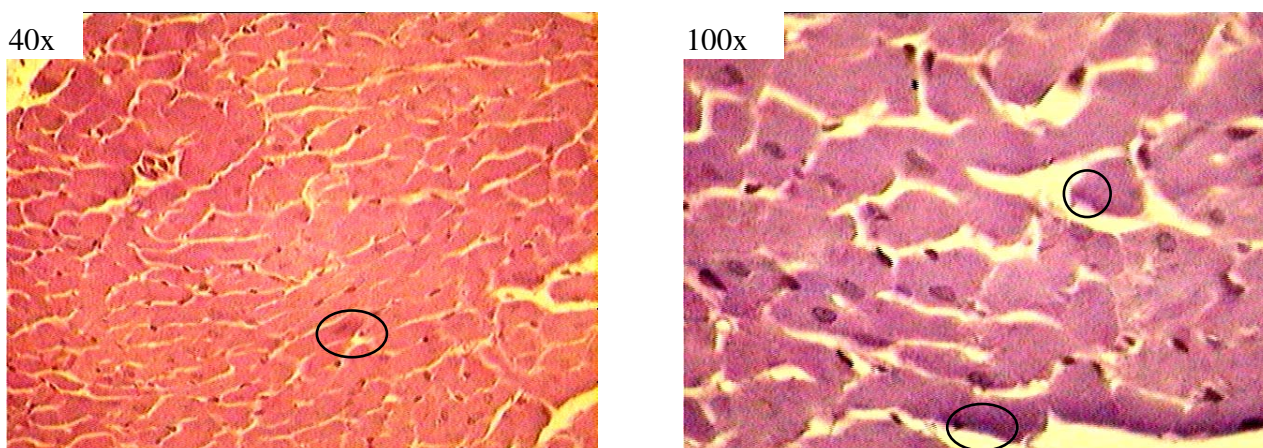


Figura 7) A figura mostra regiões do ventrículo de ratos diabéticos. Ampliações mostram detalhes da quantidade de glicogênio evidenciado pelo método de Schiff (PAS).

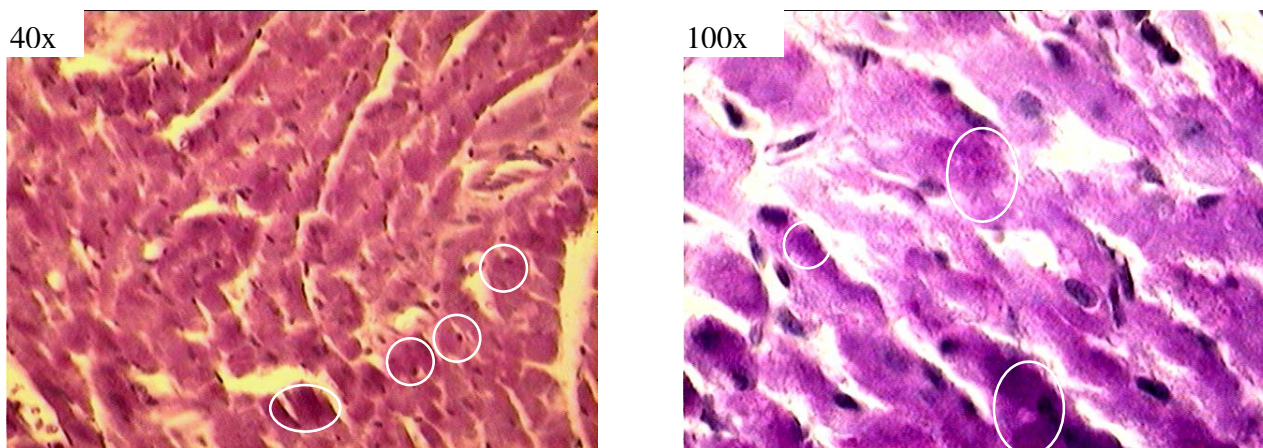


Figura 8) Regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com baixas doses de metformina ($3.5 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ pc}$). Ampliações mostram detalhes da quantidade de glicogênio pelo método de Schiff (PAS).

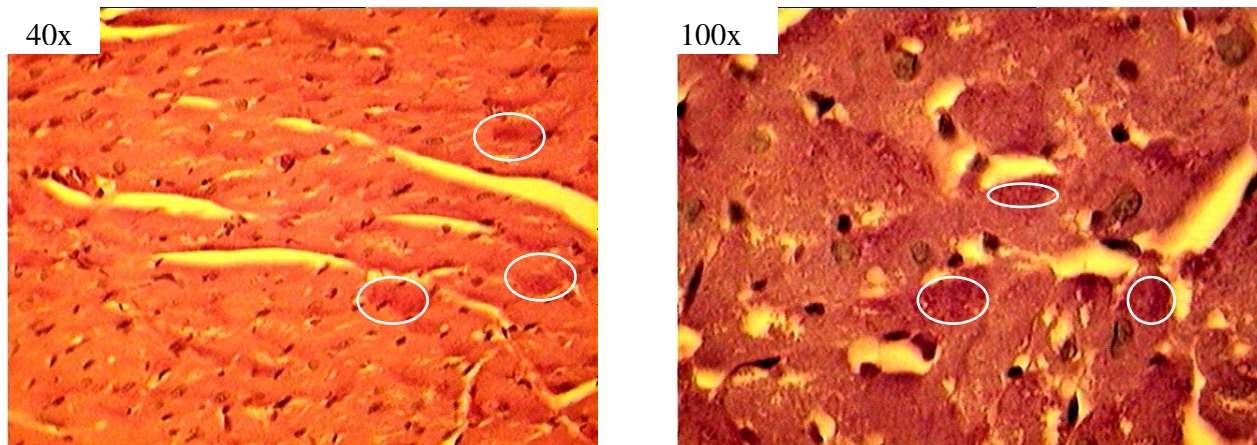


Figura 9) A figura mostra regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com doses intermediárias de metformina ($30 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ pc}$). Ampliações mostram detalhes da quantidade de glicogênio pelo método de Schiff (PAS).

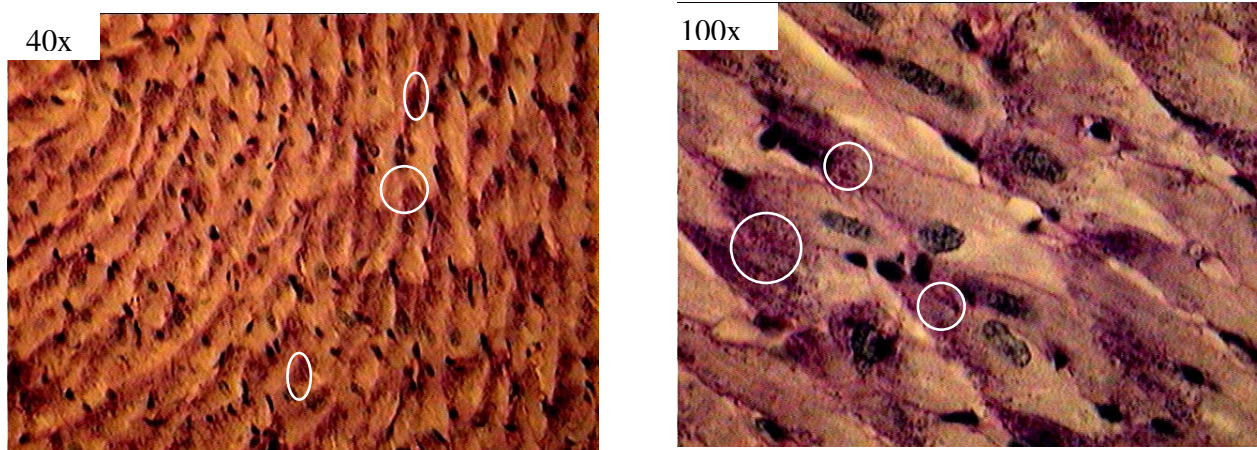


Figura 10) A figura mostra regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com altas doses de metformina ($74 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ pc}$). Ampliações mostram detalhes da quantidade de glicogênio pelo método de Schiff (PAS).

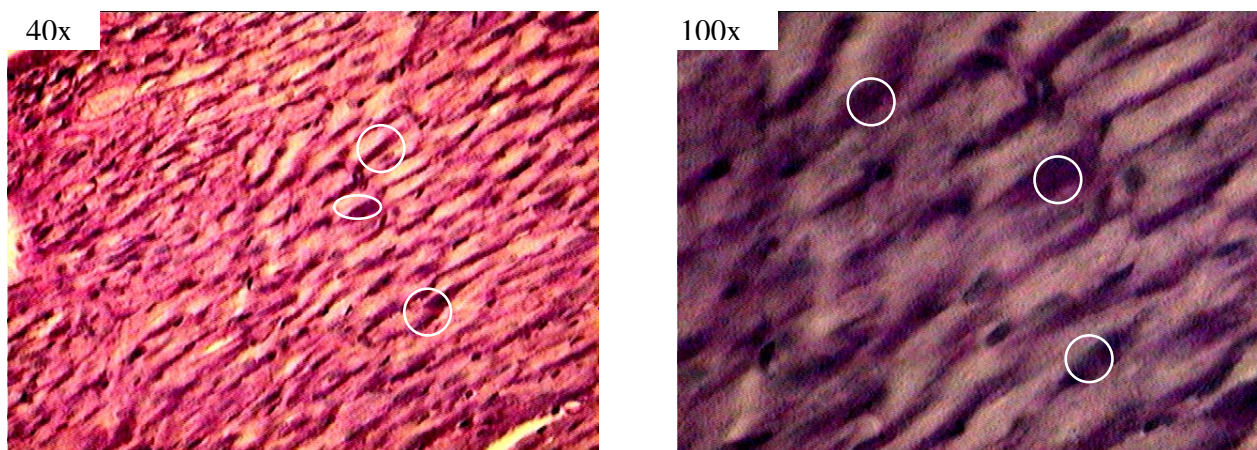


Figura 11 A, B, C: Mudanças na pressão sistólica ventricular, dP/dt^+ e dP/dt^- nos grupos Controle (C), Diabetes (D), Diabetes Metformina 3,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pc (DM 3,5), Diabetes Metformina 30 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pc (DM 30) e Diabetes Metformina 74 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pc (DM 74) após 60 minutos de perfusão com noradrenalina. “a” $p < 0.05$ vs controle; “b” $p < 0.05$ vs diabetes; “c” $p < 0.05$ vs diabetes metformina 3,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pc; “d” $p < 0.05$ vs diabetes metformina 30 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pc.

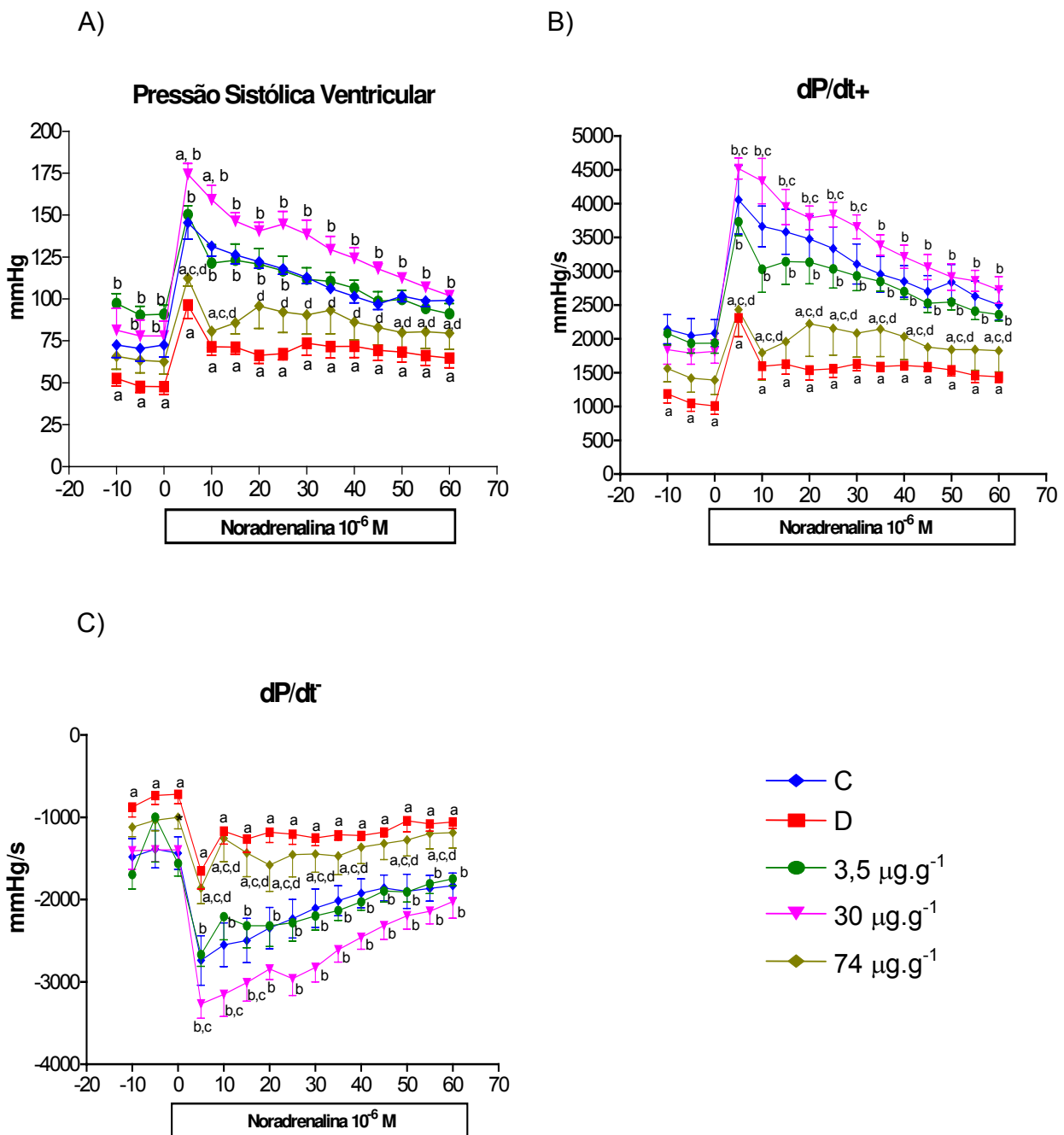


Figura 12 A, B: Alterações no glicogênio ventricular de corações antes e após perfusão durante 60 minutos com noradrenalina após indução de diabetes por aloxana e após 15 ou 30 dias de tratamento com metformina. “a” $p < 0.05$ vs controle (C); “b” $p < 0.05$ vs diabetes (D); “c” $p < 0.05$ vs diabetes metformina $3,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ pc; “d” $p < 0.05$ vs diabetes metformina $30 \mu\text{g.g}^{-1}$ pc.

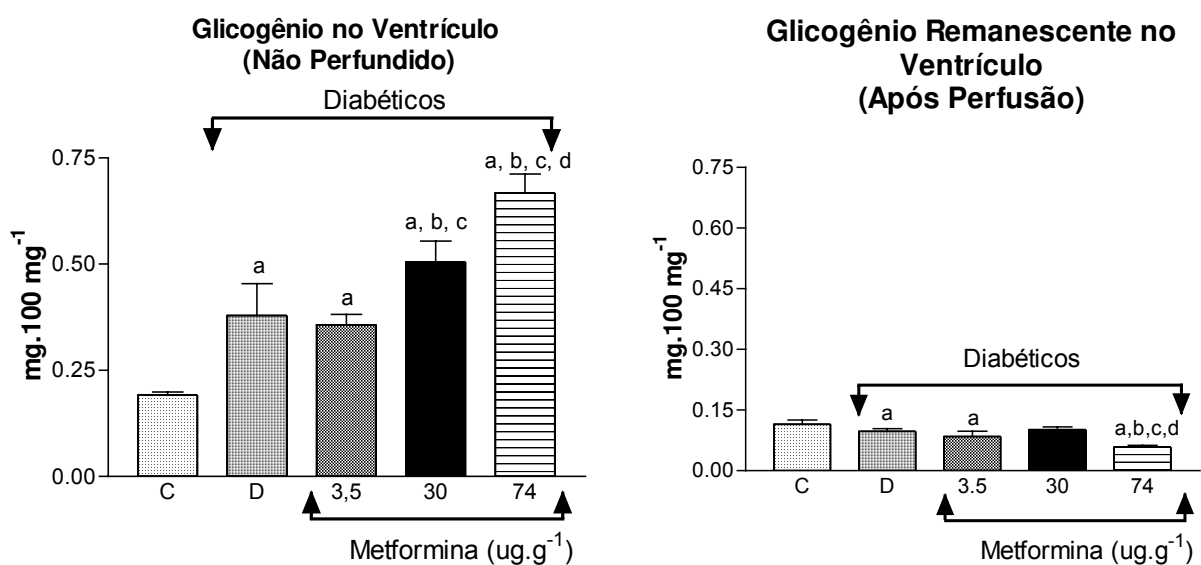


Figura 13) Efeito dose-resposta da metformina sobre o número de núcleos das células do ventrículo cardíaco. O coração foi removido de ratos dos grupos diabético, tratados ou não com metformina e grupo controle. “a” $p < 0,05$ vs Controle (C), “b” $p < 0,05$ vs Diabetes (D), “c” $p < 0,05$ vs DM 3,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pc, “d” $P < 0,05$ vs DM 30 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pc.

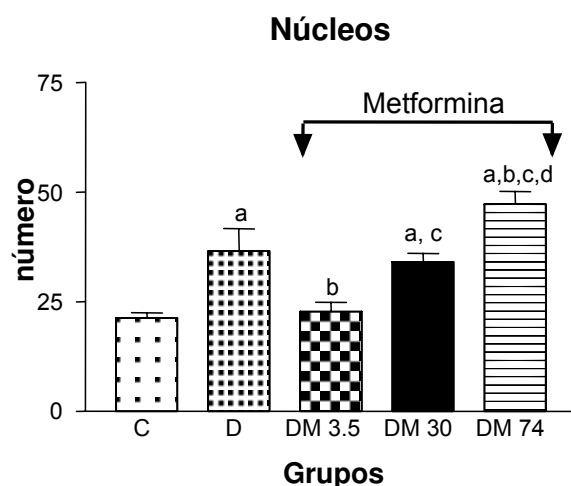


Figura 14) Efeito dose resposta da metformina sobre a área do núcleo das células do ventrículo cardíaco. Os corações foram removidos de diabéticos, tratados ou não, e comparados ao grupo controle. “a” $p < 0,05$ vs Controle (C), “b” $p < 0,05$ vs Diabetes (D), “c” $p < 0,05$ vs DM 3,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pc, “d” $P < 0,05$ vs DM 30 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pc.

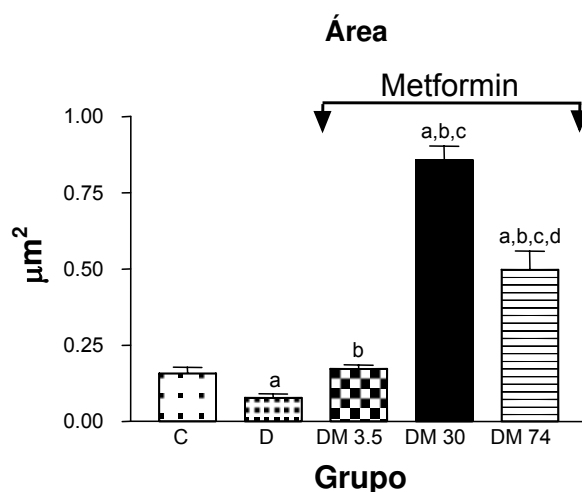


Figura 15) A figura mostra regiões do ventrículo de ratos não diabéticos (controle). Ampliações (100x) mostram detalhes da quantidade e área do núcleo (HE).

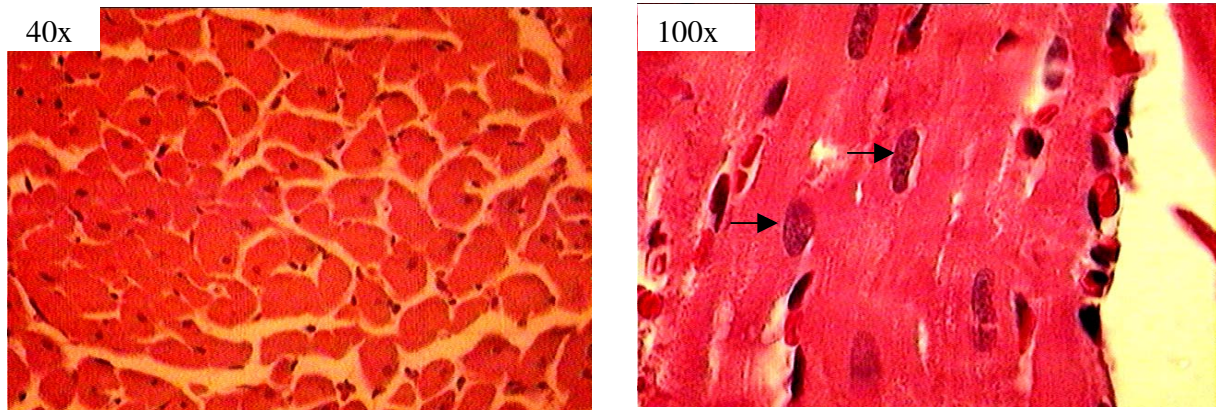


Figura 16) Regiões do ventrículo de ratos diabéticos. Ampliações mostram detalhes da área e da quantidade de núcleos (HE).

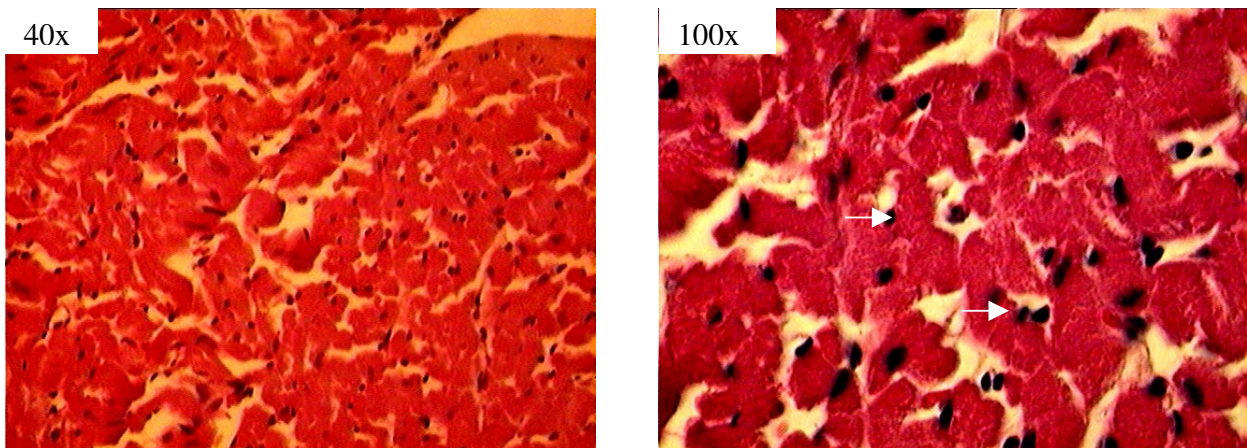


Figura 17) Regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com baixas doses de metformina ($3.5 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ pc}$), mostrando a área e a quantidade de núcleos (HE).

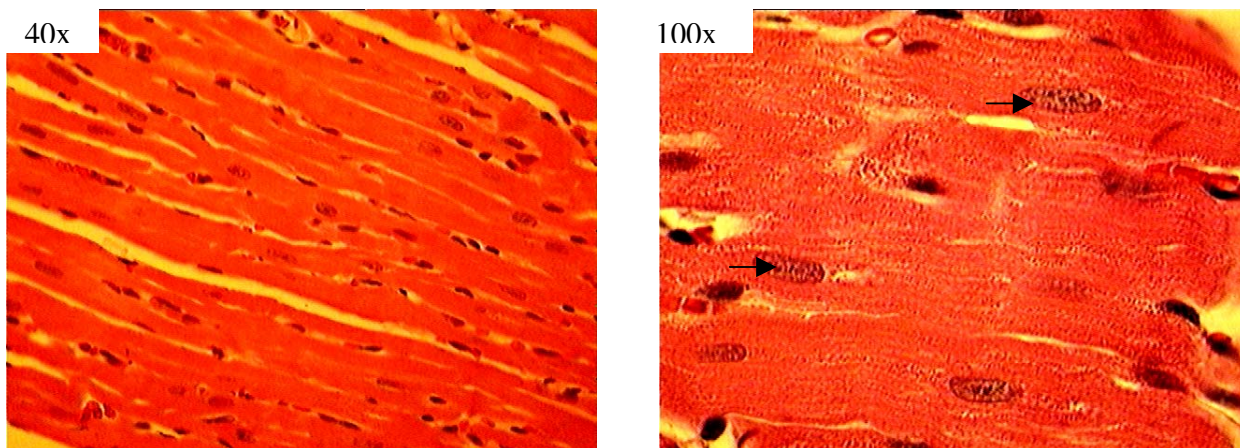


Figura 18) A figura mostra regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com doses intermediárias de metformina ($30 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ p.c.}$). Ampliações mostram detalhes da área e da quantidade de núcleos (HE).

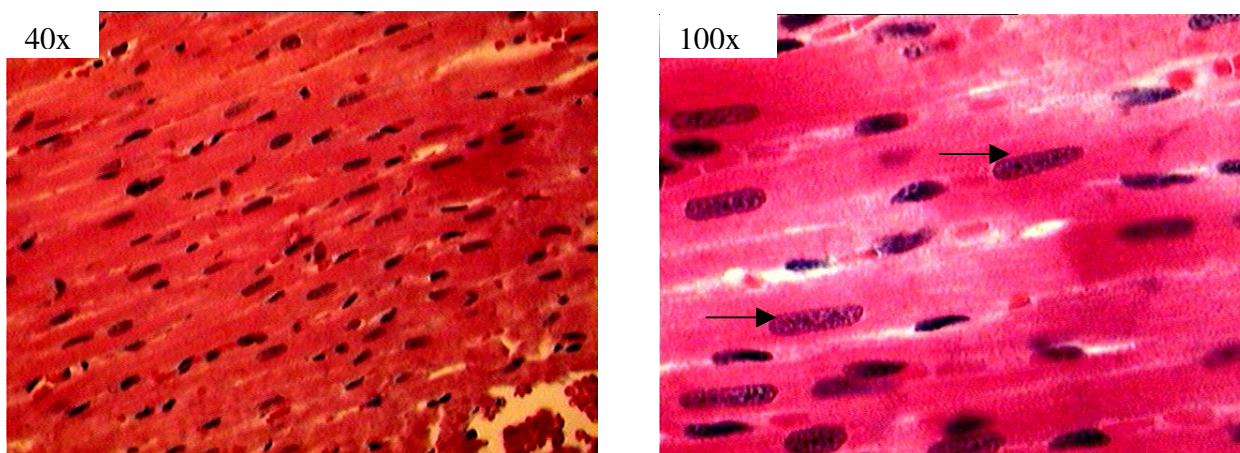


Figura 19) A figura mostra regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com alta doses de metformina ($74 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ pc}$). Ampliações mostram detalhes da área da quantidade de núcleos (HE).

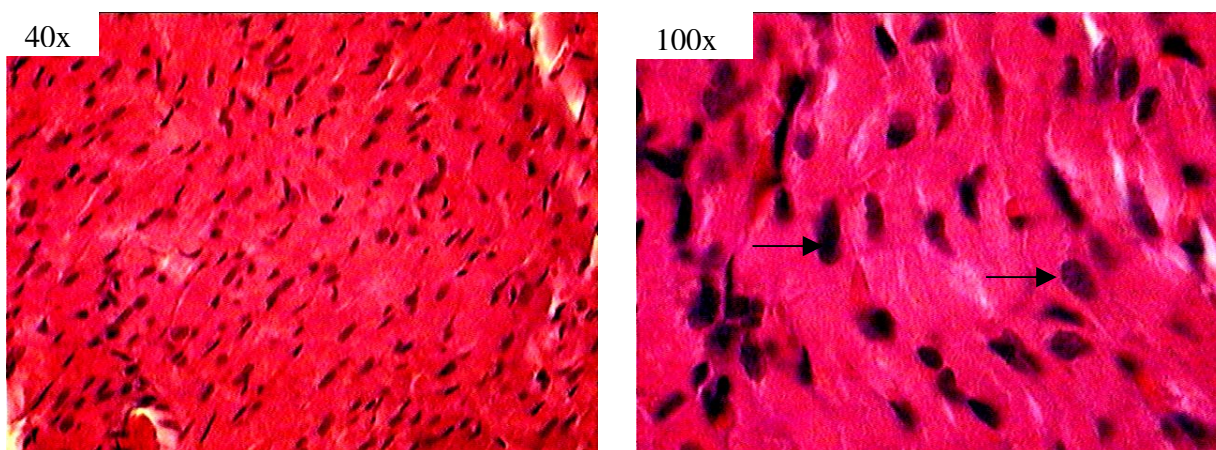
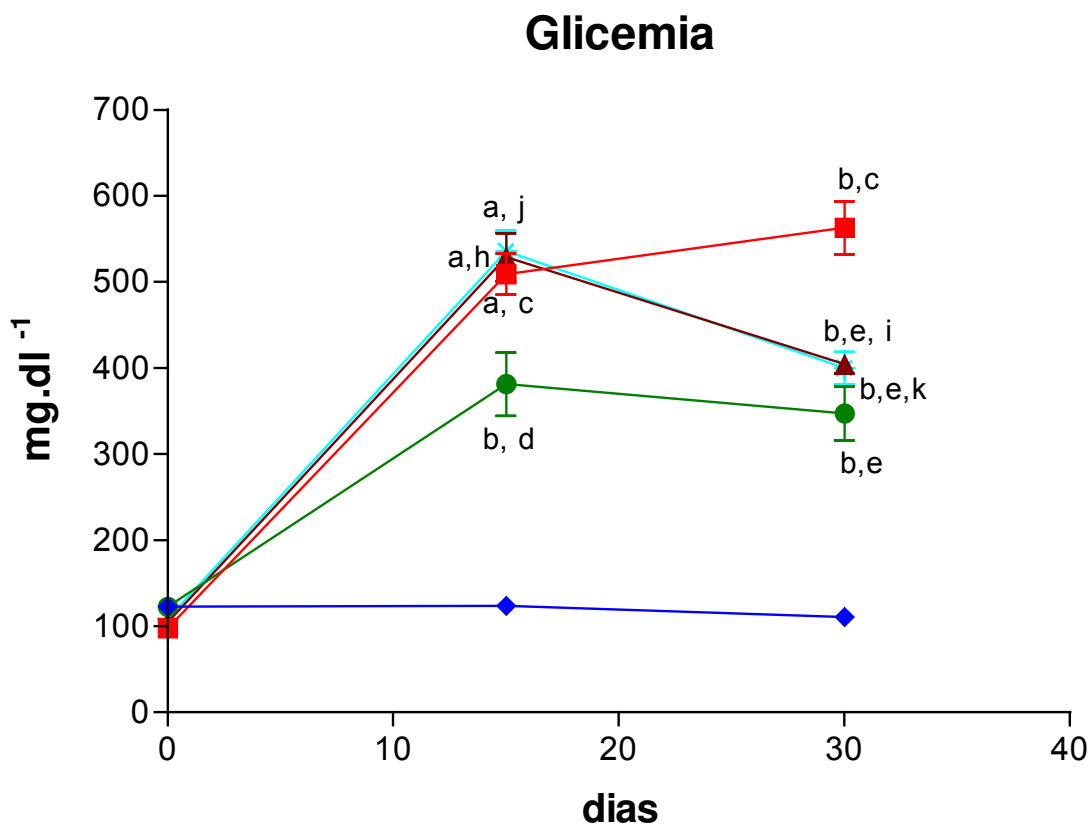
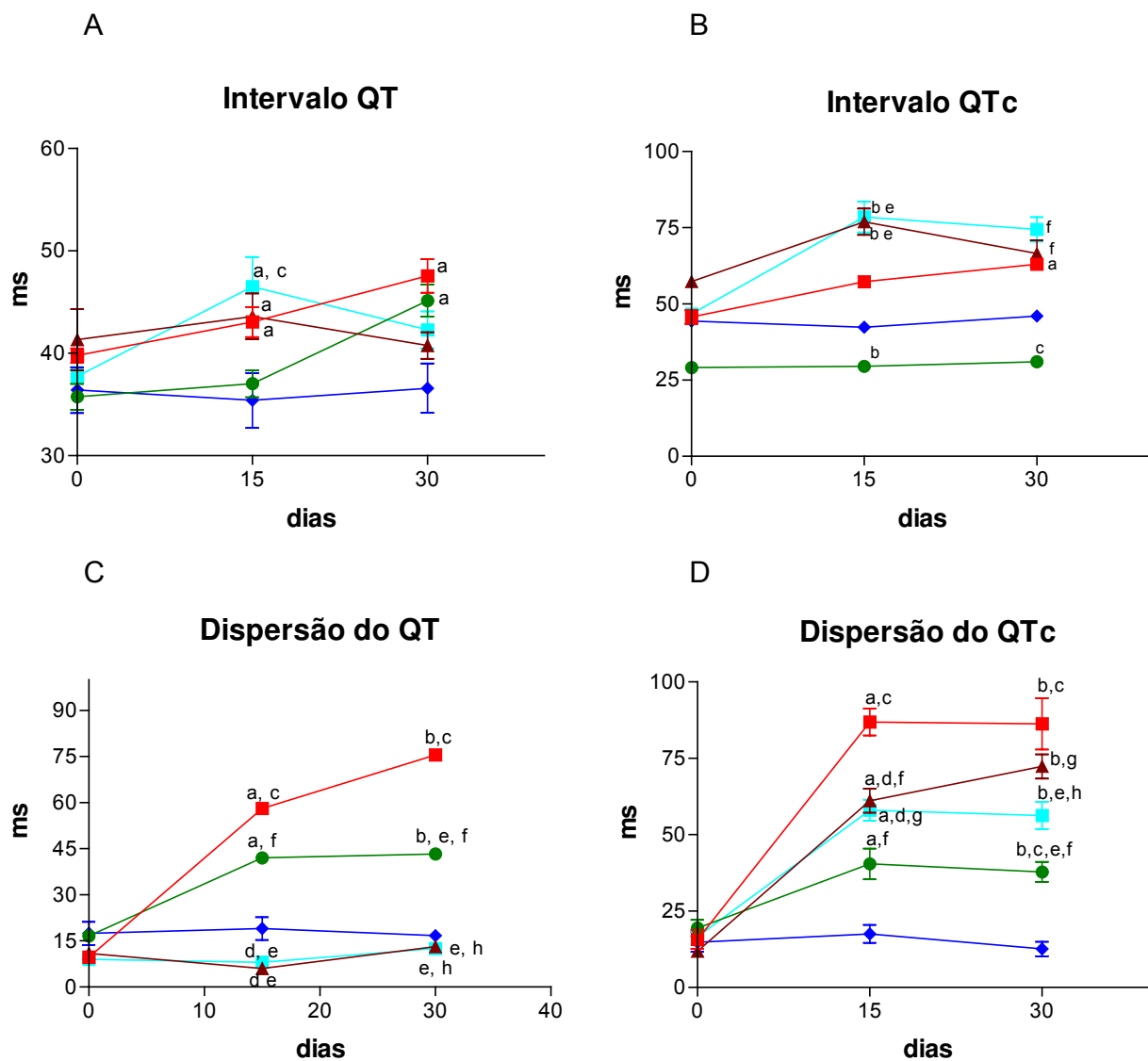


Figura 20: Concentração plasmática de glicose (mg.dl^{-1}) após indução de diabetes por aloxana e após 15 e 30 dias de tratamento com metformina (DM) e/ou glibenclamida (DG, DGM).



“a” $p < 0.05$ vs controle-15 dias (—♦—); “b” $p < 0.05$ vs controle-30 dias (—♦—); “c” $p < 0.05$ vs diabetes-0 (—■—); “d” $p < 0.05$ vs diabetes-15 dias (—■—); “e” $p < 0.05$ vs diabetes 30-dias (—■—); “f” $p < 0.05$ vs DM-0 (—●—); “g” $p < 0.05$ vs DM-15 (—●—); “h” $p < 0.05$ vs DG-0 (—▲—); “i” $p < 0.05$ vs DG-15 (—▲—); “j” $p < 0.05$ vs DGM-0 (—*—); “k” $p < 0.05$ vs DGM-15 (—*—).

Figura 21 A, B, C, D: Mudanças nos intervalos QT, QTc, QTd e QTcd após 15 e 30 dias de tratamento com metformina (DM) e/ou glibenclamida (DG, DGM).



“a” $p < 0.05$ vs controle-15 dias (◆); “b” $p < 0.05$ vs controle-30 dias (◆); “c” $p < 0.05$ vs diabetes-0 (■); “d” $p < 0.05$ vs diabetes-15 dias (■); “e” $p < 0.05$ vs diabetes 30-dias (■); “f” $p < 0.05$ vs DM-0 (●); “g” $p < 0.05$ vs DG-0 (▲); “h” $p < 0.05$ vs DGM-0 (◆).

Figura 22: Conteúdo de glicogênio ($\text{mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$) de coração não perfundido após indução de diabetes por aloxana e após tratamento com metformina (M) e/ou glibenclamida (G) por 30 dias. “a” $p < 0.05$ vs controle (C); “b” $p < 0.05$ vs diabetes (D); “c” $p < 0.05$ vs diabetes metformina $3,5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ pc (DM); “d” $p < 0.05$ vs diabetes glibenclamida (DG).

Glicogênio do Ventrículo (não perfundido)

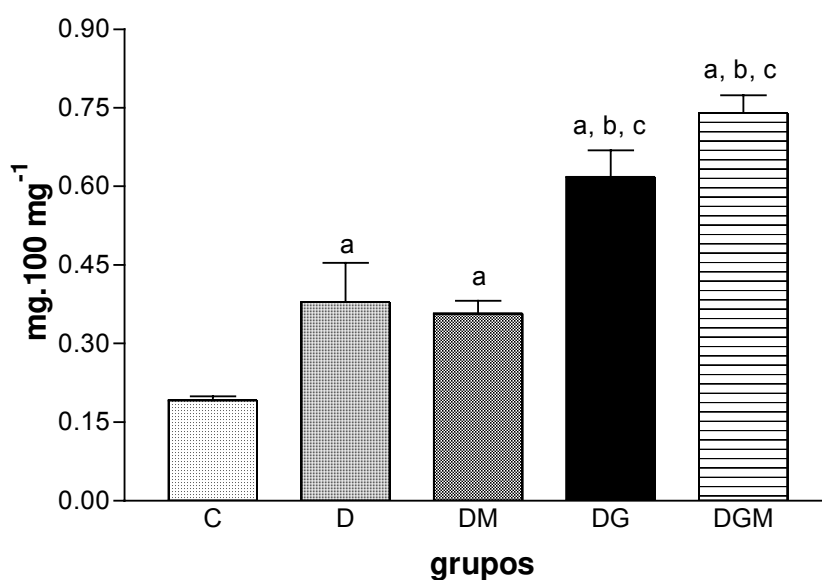


Figura 23) A figura mostra regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com glibenclamida. Ampliações mostram detalhes da quantidade de glicogênio pelo método de Schiff (PAS).

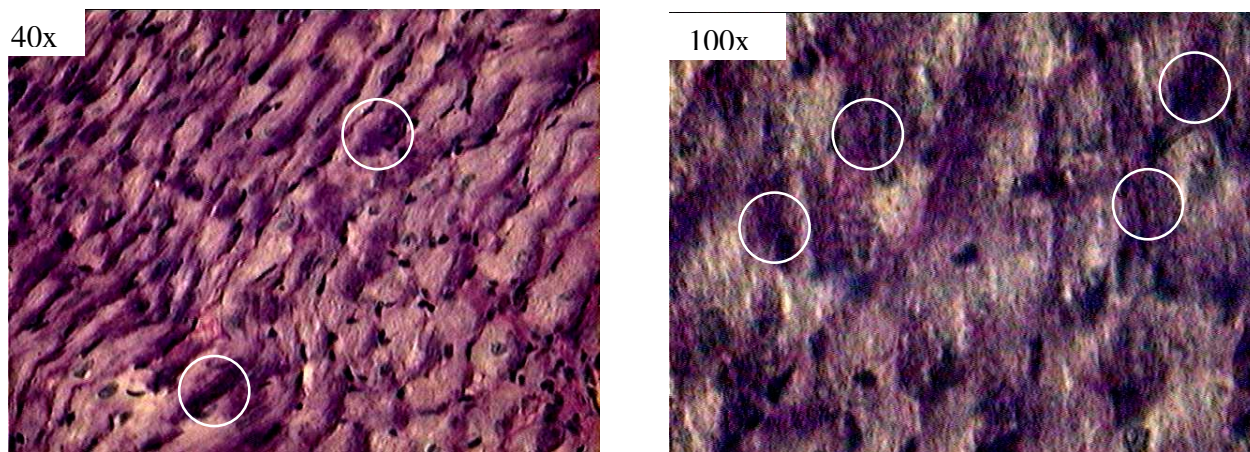


Figura 24) A figura mostra regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com a associação metformina e glibenclamida. Ampliações mostram detalhes da quantidade de glicogênio pelo método de Schiff (PAS).

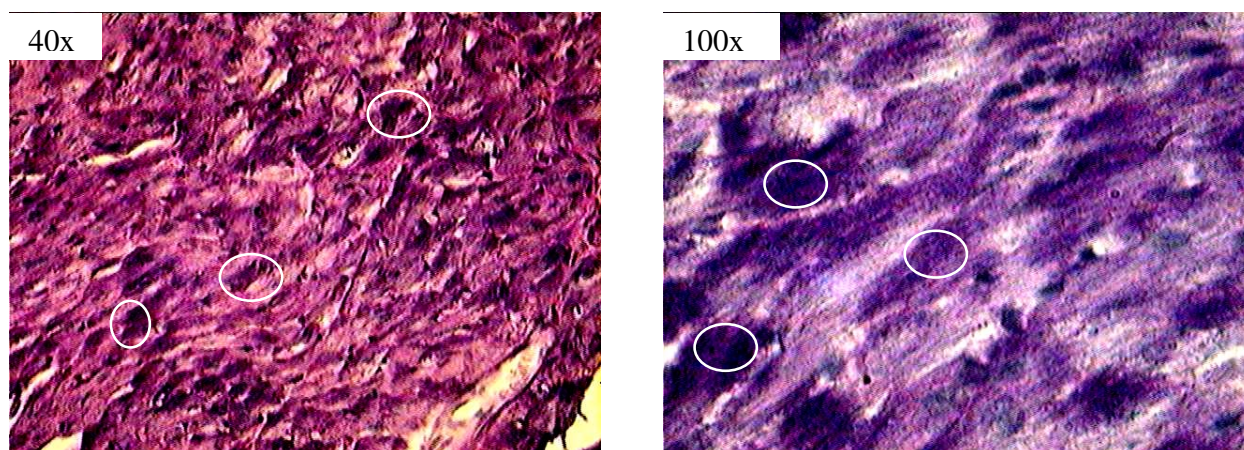


Figura 25 A, B, C: Mudanças na pressão sistólica ventricular, dP/dt^+ e dP/dt^- nos grupos Controle (C), Diabetes (D), Diabetes Metformina $3,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ pc (DM), Diabetes Glibenclamida (DG) e Diabetes Metformina/Glibenclamida (DGM) após 60 minutos de perfusão com noradrenalina. “a” $p < 0.05$ vs controle; “b” $p < 0.05$ vs diabetes; “c” $p < 0.05$ vs diabetes metformina e “d” $p < 0,05$ vs glibenclamida.

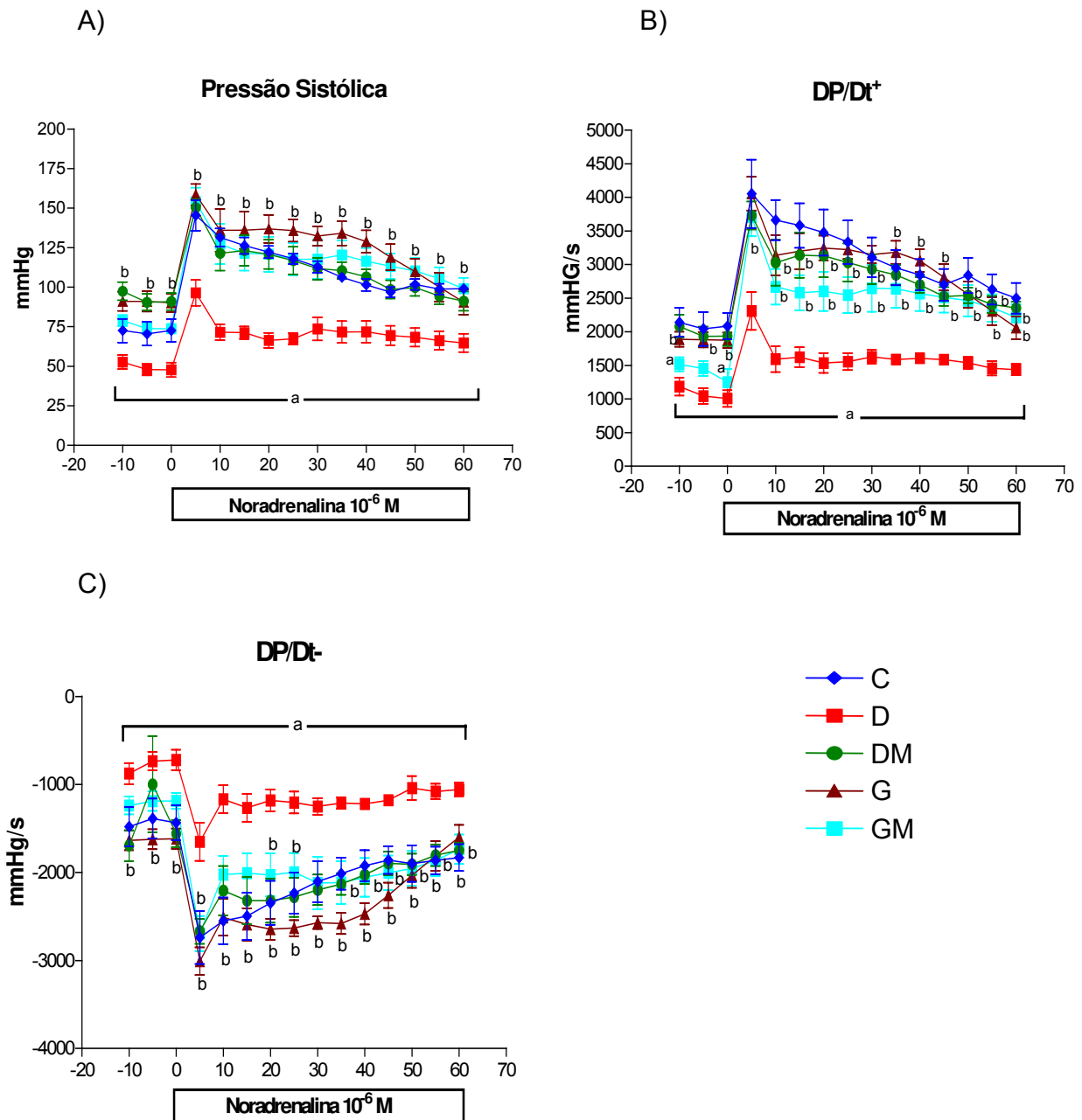


Figura 26: Alterações no glicogênio ventricular de corações antes e após perfusão por 60 minutos com noradrenalina após indução de diabetes por aloxana e após 15 ou 30 dias de tratamento com metformina e/ou glibenclamida. “a” $p < 0.05$ vs controle (C); “b” $p < 0.05$ vs diabetes (D); “c” $p < 0.05$ vs diabetes metformin $3,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ pc (DM); “d” $p < 0.05$ vs diabetes glibenclamida (DG).

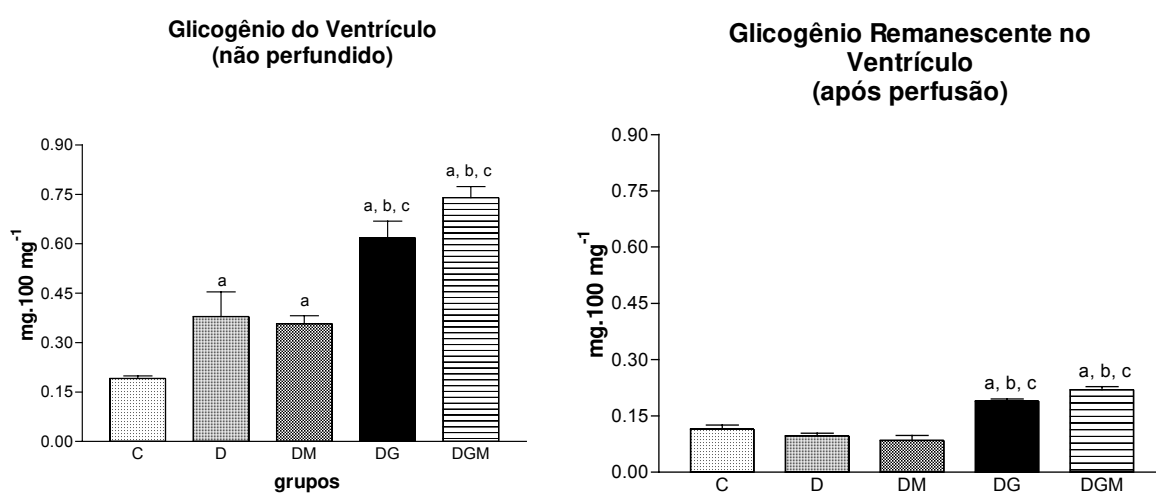


Figura 27) Efeito do tratamento com metformina e/ou glibenclamida sobre o número de núcleos das células do ventrículo cardíaco. O coração foi removido de ratos dos grupos diabético, tratados ou não e do grupo controle. “a” $p < 0,05$ vs Controle (C), “b” $p < 0,05$ vs Diabetes (D), “c” $p < 0,05$ vs Diabetes Metformina $3,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ pc (DM), “d” $p < 0,05$ vs diabetes glibenclamida (DG).

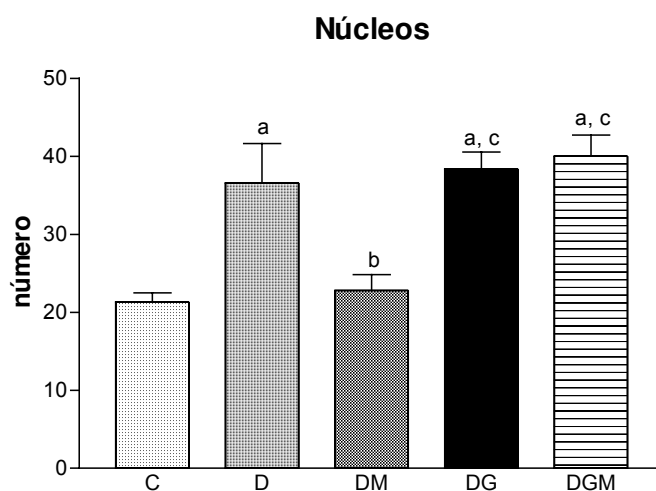


Figura 28) Efeito do tratamento com metformina e/ou glibenclamida sobre a área do núcleo das células do ventrículo cardíaco. Os corações foram removidos de diabéticos, tratados ou não, e comparados ao grupo controle. “a” $p < 0,05$ vs Controle (C), “b” $p < 0,05$ vs Diabetes (D), “c” $p < 0,05$ vs Diabetes Metformina $3,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ pc (DM), “d” $p < 0,05$ vs diabetes glibenclamida (DG).

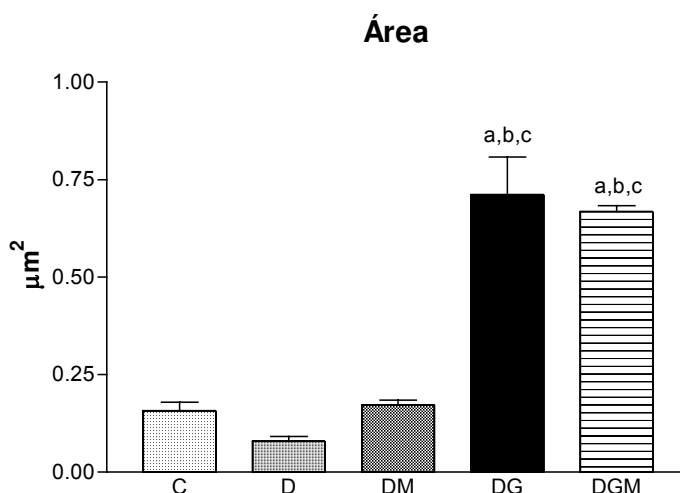


Figura 29) A figura mostra regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com glibenclamida. Ampliações mostram detalhes da área e da quantidade de núcleos (HE).

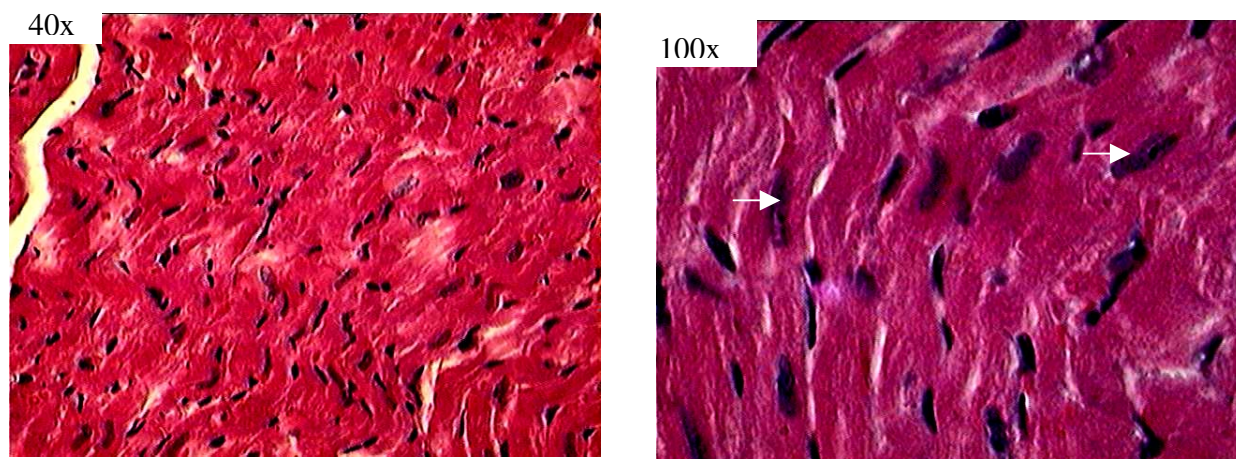
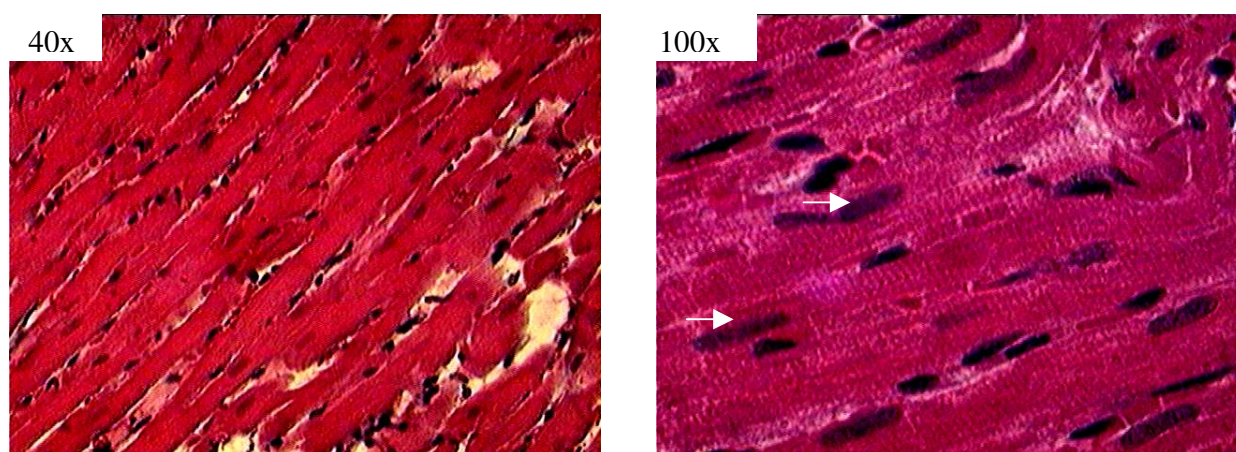


Figura 30) A figura mostra regiões do ventrículo de ratos diabéticos tratados com a associação metformina e glibenclamida. Ampliações mostram detalhes da área e da quantidade de núcleos (HE).



Capítulo

5

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeitos do Diabetes

O diabetes promove alterações metabólicas envolvendo o transporte, armazenamento e a degradação de várias substâncias utilizadas pelas células como fonte energética.

As alterações do metabolismo lipídico em diabéticos aumentam os riscos de aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (BODEN, 1997), as quais também podem ocorrer em virtude de mudanças no metabolismo de carboidratos do músculo cardíaco, com déficit de função que podem causar a morte, por exemplo, como consequência de uma isquemia prolongada (HIGUCHI et al, 1991).

As alterações do metabolismo no diabético decorrem da ausência ou de secreção deficiente de insulina, levando conseqüentemente, à diminuição da captação de glicose e ao aumento da produção de glicose, resultando em hiperglicemia. Nossos resultados acompanharam dados anteriores em ratos diabéticos por aloxana, mostrando aumento da glicemia em relação ao grupo controle (fig 3), como consequência da destruição das ilhotas de Langerhans (STEINER et al, 1961; SCHERER, 1955). As alterações promovidas no metabolismo de carboidratos e de lipídeos podem causar modificações na estrutura e fisiologia cardiovascular, que por sua vez, alteram o registro do eletrocardiograma. No grupo diabético registramos aumento do intervalo QT corrigido. Este se deve ao retardo na despolarização e/ou na repolarização do potencial de ação cardíaco. Segundo FEUVRAY & LOPASCHUK (1997), por esta razão, é mais difícil a recuperação do coração de diabéticos devido a uma isquemia, aumentando a possibilidade de ocorrência de morte súbita.

Anteriormente já havíamos demonstrado que ocorre aumento de glicogênio em ventrículo de ratos aloxanizados (da SILVA, 2001 e fig. 5 e 7). Outros grupos (HIGUCHI et al, 1995; FEUVRAY & LOPASCHUK, 1997; PAULSON, 1997) demonstraram também o

aumento do conteúdo de glicogênio no ventrículo cardíaco de ratos diabéticos por estreptozotocina. Estes autores sugeriram que este aumento poderia tornar os corações mais resistentes à isquemia cardíaca.

O aumento de glicogênio em cardiomiócitos é regulado por vários fatores além da insulina. O GLUT 4, que é o mais abundante transportador de glicose no coração e a proteína quinase ativada (AMPK), aumenta a transcrição de GLUT 4 em resposta ao trabalho de contração (ZHENG et al, 2001) auxiliando no transporte de glicose. A própria contração também estimula o transporte de glicose em cardiomiócitos (KOLTER et al, 1992; WHEELER et al, 1994).

O sistema nervoso central regula o transporte de glicose, via inervação simpática, pela liberação das catecolaminas e serotonina que promovem a translocação de GLUT4 e GLUT1 para a membrana (FISCHER, 1996; FISCHER et al, 1996; ZORZANO et al, 1997). O efeito das catecolaminas intermediado pela ativação de receptores α_1 -adrenérgicos e independe da contração cardíaca e da presença de insulina (FISCHER et al, 1996).

Aparentemente o aumento do conteúdo de glicogênio no ventrículo de diabéticos está associado ao grau de severidade e à duração do diabetes, ao contrário do que se pensava. Para HIGUCHI e colaboradores (1995), este aumento torna o coração mais susceptível aos efeitos da isquemia. Em nosso trabalho medimos a concentração de glicogênio em coração de ratos diabéticos que foram usados na preparação de Langendorff. Nestes corações, o glicogênio foi preservado durante isquemia de curto prazo. Todavia, em isquemia de longo prazo, o glicogênio foi degradado, diminuindo o fornecimento de energia que poderia ser utilizada pelos sistemas de reposição energética e para uso da bomba de Na^+/K^+ . HIGUCHI et al (1995) concluíram que a modificação metabólica decorrente da diminuição da secreção de insulina ou, do aumento da resistência a este hormônio, reduziu a força de contração do

ventrículo e retardou a recuperação do estado elétrico cardíaco, levando-o a um estado de rigidez característico da isquemia. De acordo com estes autores, a rápida depleção do conteúdo de glicogênio é consequência da maior atividade da glicogênio fosforilase no músculo cardíaco de diabéticos em resposta à adrenalina e à noradrenalina.

Resultados semelhantes obtivemos em nossos estudos (fig. 11 A), com a redução da resposta pressórica em coração de ratos diabéticos isolado, indicando uma diminuição da força de contração durante a isquemia de longo prazo (1h), bem como a rápida depleção do glicogênio armazenado no coração destes ratos (da SILVA et al, 2003; GONÇALVES et al, 2003).

Estas alterações na função cardíaca também podem ser explicadas através da análise morfológica das fibras cardíaca. Este estudo mostrou também que o diabetes promoveu mudanças nas células miocárdicas, induzindo aumento da quantidade de núcleos e diminuindo o seu tamanho (fig 13), Segundo KAVANTZAS et al (2000), este efeito sugere a ocorrência de apoptose.

Geralmente, a morte celular tem sido morfológicamente classificada como necrose ou apoptose. Apoptose é um processo ativo, finamente regulado para controlar o número de células durante o desenvolvimento e a manutenção dos tecidos adultos. A apoptose é iniciada pela ativação de um programa de suicídio interno promovido por sinais internos ou externos. A apoptose é caracterizada pela ruptura da membrana celular, redução do volume celular, condensação da cromatina nuclear e degradação do DNA. As alterações morfológicas que seguem a apoptose são: perda do contato celular, agregação da massa densa em torno da membrana nuclear, seguido da separação do núcleo do citoplasma e a subsequente fagocitose (KAVANTZAS et al, 2000).

Algumas desordens cardíacas são associadas a apoptose, tendo sido demonstrado que ela ocorre no coração durante um número de processos fisiológicos e patológicos. Entre estes está incluída a sobrecarga de pressão que prejudica a reperfusão coronária e os mecanismos de contração que o leva à falência cardíaca, em ratos e em humanos hipertensos. Apoptose é uma das principais causas que contribuem para a redução da função ventricular (RYOKE et al, 2002). Em nosso trabalho, esta redução ficou claramente evidenciada nos corações submetidos à isquemia cardíaca por noradrenalina (fig. 11 A).

5.2. Efeitos da Metformina

Outros agentes farmacológicos também podem alterar a função cardíaca promovendo mudanças na membrana de cardiomiócitos, afetando a sua atividade enzimática, a função de receptores e o metabolismo relacionado ao transporte de íons em diabéticos (NAVARATNAM & KHATTER, 1989).

Fármacos, como a biguanida metformina, um anti-hiperglicemiante utilizado no tratamento de diabéticos tipo 2, contribuem para a diminuição da glicemia melhorando o perfil metabólico e aumentando a concentração de glicogênio no fígado e músculos (da SILVA, 2001).

O mecanismo pelo qual a metformina atua é multifatorial. Metformina aumenta a ação da insulina através do aumento da atividade de seu receptor e pela incorporação de novos transportadores de glicose à membrana (HOWLETT & BAILEY, 1999).

ZHOU et al (2001) propôs que o efeito da metformina é mediado pela ativação da AMPK, uma via que regula o estágio de biossíntese de lipídeos, fosforilando e inativando algumas enzimas chaves, tais como, a Acetil-CoA carboxilase. A AMPK regula o metabolismo de ácidos graxos livres, aumentando a captação de glicose e estimulando a

gliconeogênese através da estimulação da glicose-6-fosfato (G6P). Além disso, a AMPK induz aumento da expressão da hexoquinase e o transporte de glicose via GLUT.

Entretanto, metformina pode induzir efeitos colaterais. Isto foi demonstrado através de estudos, onde altas doses de metformina ativaram a AMPK reduzindo a responsividade das células β ao aumento de glicose e, em caso de exposição prolongada, metformina pode estimular a apoptose destas células (KEFAS et al, 2004; LECLERE et al, 2004).

Nossos resultados demonstraram que metformina, em concentrações equivalentes à máxima recomendada a pacientes humanos, não diminuem a glicemia de ratos diabéticos (fig. 3). Entretanto, em concentrações baixas, metformina foi eficiente em diminuir a glicemia.

Além de seu efeito sobre as células β , através da ativação da AMPK, as doses terapêuticas de metformina estimulam a atividade da tirosina quinase da subunidade β da porção intracelular do receptor de insulina. Porém, em altas concentrações, metformina inibe a tirosina quinase, e conseqüentemente inibe a ação da insulina (STITH et al, 1998),

Além de não baixar a glicemia, as concentrações mais altas de metformina proporcionam grande aumento do conteúdo de glicogênio ventricular em ratos diabéticos, ao contrário daqueles que foram tratados com baixas concentrações, com aumento muito menor do glicogênio (Fig. 5 e 8 – 10).

Este aumento de glicogênio é outra maneira de verificar os prejuízos causados ao coração. A metformina aumenta a ativação da AMPK e pode causar uma doença de estocagem de glicogênio, a qual imita uma cardiopatia hipertrófica e causar anormalidade eletrofisiológica, particularmente na pré-excitação, além de bloquear a condução atrio-ventricular (ARAD et al, 2001).

Anormalidades eletrofisiológicas também foram registradas em eletrocardiograma. Em concentrações baixas ($3,5 \mu\text{g.g}^{-1}$) e intermediárias ($30 \mu\text{g.g}^{-1}$), o tratamento com metformina manteve o intervalo QTc igual ao dos ratos do grupo controle (Fig 4 B), sugerindo que a condução elétrica do ventrículo foi restabelecida. Entretanto, a dose mais alta de metformina ($74 \mu\text{g.g}^{-1}$) não promoveu diminuição deste intervalo e aparentemente, não protegeu o músculo cardíaco durante a isquemia, tornando o animal mais susceptível à morte súbita.

A resposta pressórica de coração isolado mantido sob sobrecarga de trabalho em presença de noradrenalina (sob a isquemia), mostrou que o tratamento com altas concentrações de metformina resultou em picos menores, além de causar rápida queda da pressão sistólica. Estes resultados indicam ter havido diminuição da força contrátil cardíaca, sugerindo que o músculo tornou-se mais susceptível à isquemia nesta condição experimental. A resposta a altas doses de metformina pode estar relacionada a efeitos metabólicos que alteram a condutividade iônica prejudicando o fornecimento de energia para a bomba de Na^+/K^+ . Este prejuízo foi confirmado pela quase total depleção do conteúdo de glicogênio que havia sido armazenado no ventrículo, causando rigidez cardíaca. Nossos resultados demonstram que o tratamento com baixas e médias doses protege melhor o músculo cardíaco, como fica evidente através do pico de pressão sistólica mais elevado e lenta queda da pressão sistólica, aparentemente indicando bons efeitos terapêuticos.

A análise morfológica também mostrou que a diminuição da função cardíaca no grupo tratado com a maior dose de metformina pode estar associada ao aumento da quantidade de núcleos, assim como, ao seu tamanho. Ao contrário do que ocorreu nos diabéticos não tratados, não houve apoptose, porém hipertrofia evidenciada pelo aumento da atividade celular (aumento da área do núcleo), o que também causou prejuízos importantes na função cardíaca. A menor dose de metformina manteve baixa a quantidade de núcleos e causou

aumento de sua área em relação ao grupo diabético, porém, não diferiu do grupo controle. Ou seja, esta dose de metformina não promoveu apoptose ou hipertrofia cardíaca observada nos demais grupos.

5.3 Efeitos do Tratamento com Glibenclamida

A resistência à insulina prejudica a função do coração podendo causar a falência cardíaca, pois altera o mecanismo intermediado pelos efeitos da insulina. Estas alterações têm efeitos diretos sobre os canais iônicos da membrana, especialmente quanto aos canais de Ca^{2+} . Conseqüentemente, a resistência à insulina afeta a dispersão da fase de repolarização do potencial de ação ventricular e aumenta a dispersão do intervalo Q-T, o qual é considerado um dos fatores determinantes para a ocorrência de arritmias cardíacas (WATANABE et al, 1997). Além destes efeitos, SHIMONI et al (2000) identificaram mudanças em correntes de K^+ que ocorreu em condições de hipo ou hiperinsulinemia, mostrando que a insulina tem um efeito tônico modulador da intensidade das correntes de K^+ no coração.

As sulfoniluréias estimulam a secreção de insulina e são amplamente empregadas no tratamento do diabetes tipo 2. Seu principal alvo é o canal de K^+ sensível a ATP (K_{ATP}), o qual desempenha papel importante no controle do potencial de membrana celular. O fechamento dos canais de K_{ATP} , seja em virtude do bloqueio pelo ATP ou pelas sulfoniluréias, promove a despolarização da membrana celular e, conseqüentemente, ativa o mecanismo de abertura de canais de Ca^{2+} . O influxo de Ca^{2+} estimula a exocitose dos grânulos contendo insulina (GRIBBLE et al, 1998).

A figura 20 mostra o efeito da glibenclamida em diminuir a glicemia de ratos diabéticos após 30 dias do início do tratamento.

Canais de K_{ATP} também são encontrados em uma variedade de tipos celulares, incluindo músculos cardíaco, liso e esquelético (GRIBBLE et al, 1998). Os canais K_{ATP} são constituídos por apenas 2 subunidades: a subunidade Kir6.2 e o receptor SUR, que possui alta afinidade para as sulfoniluréias (CLEMENT IV et al, 1997; INAGAKI et al, 1997; SHYNG et al, 1997). A subunidade Kir6.2 é encontrada nas células β do pâncreas e nas cardíacas, nas quais o SUR atua como uma subunidade regulatória. Os canais K_{ATP} são alvos de agentes farmacológicos, incluindo as sulfoniluréias, que funcionam como bloqueadoras (ASHCROFT & ASHCROFT, 1992).

Segundo GARLID et al (1997) e QUAST et al (2004), os canais K_{ATP} contribuem para o controle do fluxo sanguíneo coronário em repouso ou durante a hipóxia. Além disso, eles são necessários para a adaptação do coração ao estresse, pois a sua abertura na membrana mitocondrial exerce um papel protetor durante a isquemia cardíaca. Portanto, a inibição dos K_{ATP} pode aumentar os riscos durante doenças cardiovasculares.

Em nosso estudo, observamos anormalidades no registro eletrocardiográfico de ratos tratados com glibenclamida, particularmente o intervalo Q-T. Provavelmente, o bloqueio dos canais K_{ATP} causou prolongamento do período de atividade elétrica ventricular, como pode ser notado pelo aumento dos intervalos QT e sua derivada QTc (figs. 21 A-B). Estas alterações podem ser decorrentes de problemas durante o processo de repolarização ventricular, as quais têm sido associadas ao risco de morte súbita em pacientes diabéticos (OKIN et al, 2004). Estes retardos na repolarização ventricular podem produzir arritmias associadas a alterações na duração do ciclo cardíaco. Segundo estes autores, a heterogeneidade na dispersão dos intervalos QT e QTc permite estabelecer um prognóstico adicional em relação à mortalidade entre os diabéticos, em virtude do aumento no período de repolarização.

O aumento do QTd e do QTcd, observado no grupo diabético, tratado com glibenclamida (figs. 21 C-D), pode estar relacionado à falência congestiva do coração, à síndrome do QT longo, à doença cardíaca isquêmica, ao infarto do miocárdio, à hipertrofia do ventrículo esquerdo, à falência crônica renal, às arritmias e, finalmente, à morte súbita (NAJEED et al, 2002).

Por outro lado, a elevação do glicogênio cardíaco pode aumentar a susceptibilidade de ratos ao risco de morte súbita durante a isquemia (HIGUCHI et al, 1995). Registramos, entretanto, que apesar do aumento do glicogênio nos ratos diabéticos tratados com glibenclamida (figs. 22 - 24), a pressão sistólica e as suas derivadas, DP/Dt^+ e DP/Dt^- , avaliadas pelo método de Langendorff, sob isquemia por adição de noradrenalina, demonstram que durante este curto período a função cardíaca foi preservada. Talvez a duração do tratamento tenha sido insuficiente para induzir alterações cardíacas mais drásticas.

Apesar do grupo tratado com glibenclamida haver armazenado grande quantidade de glicogênio no coração (três vezes maior do que no grupo controle), houve utilização de cerca de 70% da reserva durante o período de isquemia (fig. 26). Pode-se deduzir, portanto, que houve aumento da atividade da glicogênio fosforilase no grupo experimental durante este período, já que o coração de ratos controle utilizou apenas 51% do glicogênio armazenado. Esta análise também é apoiada pelos trabalhos de HIGUCHI et al (1995), que verificaram significativo aumento da atividade da glicogênio fosforilase em coração de ratos diabéticos sob isquemia miocárdica.

O aumento de risco cardiovascular, provocada pela glibenclamida, também foi evidenciado pela análise morfológica das células cardíacas (figs. 27 - 30), onde observamos um aumento significativo no tamanho e na quantidade de núcleos em células ventriculares de

ratos tratados com glibenclamida. Estes resultados sugerem aumento da atividade celular, o que pode ter causado a hipertrofia, seja decorrente de aumento na síntese protéica, seja pelo aumento do glicogênio cardíaco.

5.4 Efeitos da Associação Metformina e Glibenclamida

Glibenclamida e metformina tem sido amplamente utilizadas, isoladamente ou em combinação, no tratamento de diabéticos tipo 2. A associação entre glibenclamida e metformina aumenta os efeitos do tratamento, já que a primeira aumenta a secreção de insulina e a segunda aumenta a eficácia da ação da insulina (UKPDS Group, 1998, OLSSON et al, 2000).

Todavia, a utilização simultânea destes fármacos tem sido associada ao aumento da mortalidade em virtude dos efeitos simultâneos destas sobre o coração (FISMAN et al, 2004). Por esta razão, avaliamos se estes riscos persistem quando utilizamos a menor dose de metformina associada a glibenclamida, a qual isoladamente, diminuiu os efeitos adversos no músculo cardíaco.

Quanto à glicemia, a associação entre metformina e glibenclamida não trouxe benefício aos ratos diabéticos, em relação aos seus efeitos isoladamente (fig. 20).

Quanto aos registros eletrocardiográficos, a associação entre ambas promoveu aumento dos intervalos QT e QTc, assim como, de suas derivadas QTd e QTcd, em comparação ao tratamento com metformina, isoladamente, porém sem diferir dos resultados do tratamento com a glibenclamida, isoladamente (figs. 21 A – D). Isto sugere que os efeitos adversos da glibenclamida sobre os canais K_{ATP} no coração não foram abolidos ao associarmos glibenclamida a uma baixa dose de metformina. Neste grupo experimental, o

aumento dos intervalos QT, QTc e de suas derivadas QTd e QTcd indicaram risco de morte súbita.

O estudo do conteúdo de glicogênio no músculo cardíaco permite deduzir que a associação não trouxe benefício aparente, pois aumentou demasiadamente o glicogênio cardíaco, isto é, três vezes mais do que no grupo controle (figs. 22 – 24). Contudo, assim como ocorreu durante o tratamento com glibenclamida, apesar de aumentar os riscos de morte súbita devido ao aumento do intervalo QTc e de suas derivadas, a função cardíaca foi preservada durante a isquemia de longa duração nos ratos tratados com glibenclamida e metformina (método de Langendorff).

Apesar da função cardíaca ter sido preservada, observamos redução significativa do conteúdo de glicogênio no músculo cardíaco, assim como ocorreu durante o tratamento com glibenclamida, isoladamente.

A análise histológica corroborou nossos resultados anteriores. A associação entre a metformina e a glibenclamida não mostrou diferenças quanto à eficiência do tratamento com glibenclamida isoladamente. Entretanto, novamente observamos aumento significativo no tamanho e na quantidade de núcleos das células ventriculares em comparação ao grupo tratado apenas com metformina.

Estes resultados sugerem que a associação entre a metformina e a glibenclamida não produziu os efeitos benéficos de baixas doses de metformina isoladamente, enquanto os efeitos adversos da glibenclamida sobre o músculo cardíaco foram mantidos, mas sem agravar os parâmetros analisados.

Capítulo

6

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO:

- Em baixas doses, metformina reduziu a glicemia e induziu um pequeno aumento do glicogênio armazenado no músculo cardíaco. Além disso, a morfologia e a função cardíaca dos ratos diabéticos submetidos à isquemia foram preservadas, diminuindo conseqüentemente, o risco de morte súbita.
- Altas doses de metformina não diminuíram a hiperglicemia em ratos diabéticos, porém aumentou o conteúdo de glicogênio ventricular. Também foi diminuída a força contrátil, tornando o coração mais susceptível à isquemia. Além disso, este tratamento aumentou a duração dos intervalos QT e QTc, bem como de suas derivadas, aumentando o risco de morte súbita.
- A glibenclamida diminuiu a glicemia dos ratos diabéticos. Porém, à semelhança da metformina em altas doses, aumentou o glicogênio e os intervalos QT e QTc e suas respectivas derivadas, o que também sugere, aumento do risco de morte súbita.
- A associação entre metformina e glibenclamida não produziu melhoras quanto ao tratamento com glibenclamida isoladamente. Na verdade, a associação entre estas drogas reduziu os efeitos benéficos já verificados usando baixa dose de metformina.

Para finalizar, sugerimos que baixas doses de metformina podem ser mais eficientes para o controle do diabetes tipo 2, para preservar a função cardíaca durante isquemia, reduzindo assim, o risco de morte súbita. Por outro lado, o tratamento associando metformina e glibenclamida parece afetar negativamente os efeitos favoráveis da metformina isoladamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, R.H.; RAZAVI, R.; TAYLOR, A.M. Cardiac anatomy revisited. **J.Anat.**, 205: 159–177, 2004
- ARAD, M.; BENSON, D.W.; PEREZ-ATAYDE, A.R.; McKENNA, W.J.; SPARKS E.A.; KANTER, R.J.; McGARRY, K.; SEIDMAN, J.G. Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. **J Clin Invest.** 109 (3):357-622002.
- ARILDSEN, H.A.; MAY, O.; CHRISTIANSEN, E.H.; DAMSGAARD, E.M. Increased QT dispersion in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Intern. J. Cardiol.** 71: 235-242, 1999.
- ASHCROFT, S.J.; ASHCROFT, F.M. The sulfonylurea receptor. **Biochim Biophys Acta**, 15:1175(1):45-59, 1992.
- BAILEY, C.J. Metformin and intestinal glucose handling. **Diabetes Metab. Rev.**, 11:S23-S32, 1995.
- BAILEY, C.J.; TURNER, R.C. Metformin. **N. Engl. J. Med.** 334: 574-9, 1996.
- BAILEY, C.J. Insulin resistance and antidiabetic drugs. **Bioch. Pharmacol.** 58: 1511-1520, 1999.
- BAILEY, C.J. Potential new treatments for type 2 diabetes. **Trends Pharmacol Sci.** 21: 259-265, 2000.
- BALKAU, B.; HU, G.; QIAO, Q; TUOMILEHTO, J.; BORCH-JOHNSSEN, K.; PYORALA, K. ; Prediction of the risk of cardiovascular mortality using a score that includes glucose as a risk factor. **Diabetologia** 47(12):2118-28, 2004.
- BARAKAT, H.A.; VADLAMUDI, S.; MACLEAN, P.; MACDONALD, K.; PORIES, J. Lipoprotein metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Nutr. Biochem.** 7:586-598, 1996.
- BODEN, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. **Diabetes**, 46: 3-10, 1997.
- BOSIN, T.R. Stimulation of the active transport of serotonin into human platelets by hydrogen peroxide. **Biochem. Pharmacol.** 40(4): 723-9, 1990.

- CAI, Z.; LANSDELL, K.A.; SHEPPARD, D.N. Inhibition of heterologously expressed cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels by non-sulphonylurea hypoglycaemic agents. **Br. J. Pharm.** 128, 108–118, 1999.
- CHUTKOW, W.A.; SIMON, M.C.; LE BEAU, M.M.; BURANT, C.F. Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular KATP channels. **Diabetes**, 45(10):1439-45, 1996.
- CLEMENT IV, J.P.; KUNJILWAR, K.; GONZALEZ, G.; SCHWANSTECHER, M.; PANTEN, U.; AGUILAR-BRYAN, L.; BRYAN, J. Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. **Neuron**. 18 (5):827-38, 1997.
- COETZEE, W.A. Regulation of ATP sensitive potassium channel of isolated guinea pig ventricular myocytes by sarcolemmal monocarboxylate transport. **Cardiovasc Res.**, 26(11):1077-86, 1992.
- DAWIS S.N.; GRANNER, D.K. Insulin, oral hipoglicemya agente and pharmacology of the pancreas. In: **GOODMAN & GILMAN'S** The pharmacological bais of therapeutics. 9 ed, 1487-1517, Mc Graw Hill, 1996.
- DeFRONZO, R.A.; BONADONNA, R.C.; FERRANNINI, E. Pathogenesis of NIDDM. **Diabetes Care** 15(3): 318-368, 1992.
- DeFRONZO, R.A.; GOODMAN, A.M. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. **N. Engl. J. Med.** 333:541-9, 1995.
- da SILVA, E.C. Modificações das reservas metabólicas em ratos sedentários e treinados tratados com metformina. Monografia de Graduação da Faculdade de Educação Física da Universidade de Campinas (UNICAMP), 1998.
- da SILVA, E.C. Efeitos da associação metformina - exercício regular no metabolismo de ratos diabéticos. Tese de Mestrado do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2001
- da SILVA, E.C.; TEIXEIRA FRIGATTO, V.C.; MORENO Jr., H. GONÇALVES, A.A. Cardiac function in isolated heart of diabetic rat. Effect of metformin treatment under ischemia. XVIII Reunião Annual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental - FeSBE, 27 a 30 de agosto, nº. 03,040, 2003

- de GOMEZ DUMM, I.N.T.; MONTENEGRO, S.; TARRÉS, M.C.; MARTINEZ, S. M.; IGAL, R.A. Early lipid alterations in spontaneously diabetic rats. **Act Pharm. Ther. Lat**, 48 (4): 228-234, 1998.
- DÖRING, H.J. & DEHNERT, H. The isolated perfused warm-blooded heart according to langendorff. 1st English Ed. In: Methods in Experimental Physiology and Pharmacology, 1988.
- EMILIEN, G.; MALOTEAUX, J.M.; PONCHON, M. Pharmacological management of diabetes - Recent progress and future perspective in daily drug treatment. **Pharmacology & Therapeutics** 81 (1): 37-51, 1999.
- FERRER, R.; ATWATER, I.; OMER, E.M.; GONÇALVES, A.A.; CROGHAN, P. C.; ROJAS, E. Electrophysiological evidence for the inhibition of potassium permeability in pancreatic β -cells by glibenclamide. **Quart. J. Exp. Phys.** 69: 831-839, 1984.
- FEUVRAY, D.; LOPASCHUK, G.D. Controversies on the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury: the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury is decreased. **Cardiol. Res.**, 34: 113-120, 1997.
- FISCHER, Y.; THOMAS, J.; HOLMAN, G.D.; ROSE, H.; KAMMERMEIER, H. (a) Contraction-independent effects of catecholamines on glucose transport in isolated rat cardiomyocytes. **Am. J. Physiol.** 270: C1204-C1210, 1996.
- FISCHER, Y.; KAMP, J.; THOMAS, J.; PÖPPING, S.; ROSE, H.; CARPÉNÉ, C.; KAMMERMEIER, H. (b) Signals mediating stimulation of cardiomyocyte glucose transport by the α -adrenergic agonist phenylephrine. **Am. J. Physiol.** 270: C1211-C1220, 1996.
- FISMAN, E.Z.; TENENBAUM, A.; MOTRO, M.; ADLER, Y. Oral antidiabetic therapy in patients with heart disease. **Herz**, 29: 290-298, 2004.
- GARLID, K.D.; PAUCEK, P.; YAROV-YAROVY, V.; MURRAY, H.N.; DARBENZIO, R.B.; D'ALONZO, A.J.; LODGE, N.J.; SMITH, M.A.; GROVER, G.J. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. **Circ Res.** 81(6):1072-82, 1997.
- GONÇALVES, A.A., da SILVA, E.C., BRITO, I.J.L., da SILVA, C.A.; WIERNSPERGER, N., Metformin interacts with training to lower glycemia and to increase glycogen stores in diabetic rats. **Diabetologia** 42 (Suppl) 52A, 1999.
- GONÇALVES, A.A.; da SILVA, E. C.; TEIXEIRA FRIGATTO, V. C.; MORENO Jr., H. Effect of metformin treatment on the glycogen remnant on cardiac ventricle of diabetic rat. XVIII

Reunião Annual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental- FeSBE, 27 a 30 de agosto, nº. 03,040, 2003

- GREEN, H.D. Circulatory system: physical principles. In: Medical Physics, **GLASSER, O.** Chicago: Yr. Bk. Pub. vol. 2: 228, 1959.
- GRIBBLE, F.M.; TUCKER, S.J.; SEINO, S.; ASHCROFT, F.M. Tissue specificity of sulfonylureas: studies on cloned cardiac and beta-cell K (ATP) channels. **Diabetes**, 47(9):1412-8, 1998.
- GUS, I. Eletrocardiografia. O normal e o patológico. Noções básicas de vectocardiografia. Fundo Editorial BYK, 2. Ed., São Paulo, 1997.
- HAJDUCH, E.; RENCUREL, F.; BALENDRAN, A.; BATTY, I.A.; DOWNES, P.; HUNDAL, H.S. Serotonin (5-Hydroxytryptamine), a novel regulator of glucose transport in rat skeletal muscle. **J. Biol. Chem.** 274(19):13563-8, 1999.
- HERMANN, L.S. In handbook of experimental pharmacology. In: GOODMAN & GILMAN'S Ed. by Springer Verlag, 119: 374-407, 1996.
- HIGUCHI, M.; IKEMA, S.; MATSUZAKI, T.; HIRAYAMA, K.; SAKANASHI, M. Effects of norepinephrine on hypoperfusion-reperfusion injuries in hearts isolated from normal and diabetic rats. **J. Mol. Cell Cardiol.** 23: 137-148, 1991.
- HIGUCHI, M.; MIYAGI, K.; NAKASONE, J.; SAKANASHI, M. Role of high glycogen in underperfused diabetic rat hearts with added norepinephrine. **J. Cardiol. Pharm.** 26: 899-907, 1995
- HIGUCHI, M.; MIYAGI, K.; KAYO, S.; SAKANASHI, M. Acceleration of stiffness in underperfused diabetic rat hearts by glyburide, a K_{ATP} channel blocker, and its prevention by levromakalim and insulin. **Cardiov Res.** 35: 303-314, 1997.
- HOGEBOM, G.H.; SCHNEIDER, W.C.; PALADE, G.E. Cytochemical studies of mammalian tissues. I. Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. **J. Biol. Chem.** 172: 619, 1948.
- HOWLETT, H.C.S.; BAILEY, C.J. A risk-benefit assessment of metformin in type 2 diabetes mellitus. **Drug Safety**, 20(6): 489-503, 1999.
- INAGAKI, N.; GONOI, T.; SEINO, S. Subunit stoichiometry of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel. **FEBS Lett.**, 9;409(2):232-6, 1997.

- ISOMOTO, S.; KONDO, C.; YAMADA, M.; MATSUMO, S.; HIGASHIGUCHI, O.; HORIO, Y.; MATSUZAWA, Y.; KURACHI, Y. A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. **J. Biol. Chem.** 271: 24321-24324, 1995.
- KAVANTZAS, N.G.; LAZARIS, A.C.H.; AGAPITOS, E.V.; NANAS, J.; DAVARIS, P. Histological assessment of apoptotic cell death in cardiomyopathies. **Pathology**, 32:176-180, 2000.
- KEFAS, B.A.; CAI, Y.; KERCKHOFS, K.; LING, Z.; MARTENS, G.; HEIMBERG, H.; PIPELEERS, D.; VAN de CASTEELE, M. Metformin-induced stimulation of AMP-activate protein kinase in B-cells impairs their glucose responsiveness and can lead to apoptosis. **Biochemical Pharmacol.** 68 (3): 409-416, 2004.
- KOBAYASHI, T.; SOLARO, R.J. Calcium, thin filaments, and the integrative biology of cardiac contractility. **Annu Rev Physiol.** 67:39-67, 2005.
- KOLTER, T.; UPHUES, I.; WICLIELHAUS, A.; REINAUER, H.; ECKEL, J. Contraction-induced translocation of the glucose transporter GLUT4 in isolated ventricular cardiomyocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun** 189: 1207-1214, 1992.
- KUMAR, S.; KELA, A.K., MEHTA, V.L.; SHUKLA, A.K. Preferred anesthetic agents in experimental cardiology: A study on rat electrocardiogram. **Indian J. Pharmacol.** 27: 127-129, 1995.
- LARNER, J. in GOODMAN, A.; GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. As bases Farmacológicas da Terapêutica. Guanabara Koogan, 6. Ed. Rio de Janeiro, 1983.
- LAWRENCE Jr, J.C.; SKURAT, A.V.; ROACH, P.J.; AZPIAZU, I.; MANCHESTER, J. Glycogen synthase activation by insulin and effect of transgenic overexpression in skeletal muscle. **Biochem. Soc. Trans.**, 25: 1-7, 1997.
- LECRERE, I.; WOLTERSDORF, W.W.; da SILVA XAVIER, G.; ROWE, R.L.; CROSS, S.E.; KORBUTT, G.S.; RAJOTTE, R.V.; SMITH, R.; RUTTER, G.A. Metformin, but not leptin, regulates AMP-activated protein kinase in pancreatic islets: impact on glucose-stimulated insulin secretion. **Am J. Physiol. Endocrinol Metab**, 286: E1023-E1031, 2004.
- LEHNINGER, A.L.; WADKINS, C.L.; COOPER, C.; DEVLIN, T.M.; GAMBLE, J. L. Oxidative phosphorylation. **Science**, 128: 450, 1958.
- LEITER, L.A. Combination therapy with oral antihyperglycemic agents in the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Trends Endocrinol. Metab.**:216-218, 1996.
- LENGYEL, L. Eletrocardiografia Clínica. Ed Sarvier (SP), 1-24, 1974.

- LICATA, R.H.; ROBERTS, J.T. Histology of the heart. In Cardiology: LUISADA, A. A. New York: McGraw-Hill, vol 1: 67, 1959.
- LO SIU, J.C.R., RUSSEAU, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **J. Appl. Physiol.**, 28:234-236, 1970.
- LOCHNER, A.; PENTZ, A.; WILLIAMS, K.; TROMP, E.; HARPER, I.S. Substrate effects on sarcolemmal permeability in the normoxic and hypoxic perfused rat heart. **Basic Res. Cardiol.** 91: 64-78, 1996.
- LUIKEN, J.J.; COORT, S.L.; WILLEMS, J.; COUMANS, W.A.; BONEN, A.; VAN DER VUSSE, G.J.; GLATZ, J.F. Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. **Diabetes**, 52(7):1627-34, 2003.
- MARIN-GARCIA, J.; GOLDENTHAL, M.J. Heart mitochondria signaling pathways: appraisal of an emerging field. **Mol Med.** 82(9):565-78, 2004
- McVEIGH, J.J.; LOPASCHUK, G.D. Dichloroacetate stimulation of glucose oxidation improves recovery of ischemic rat hearts. **Am. J. Physiol.** 259: H1079-H1085, 1990.
- MEDA, P.; ATWATER, I.; GONÇALVES, A.A.; BANGHAM, A.; ORCI, L.; ROJAS, E.. The topography of electrical synchrony among β -cells in the mouse islet of Langerhans. **Quart. J. Exp. Physiol.**, 69: 719-735. 1984.
- MILLIKAN, G. A. Muscle hemoglobin. **Physiol. Rev.** 19: 503, 1939.
- MORGAN, H.E.; NEELY, J.R.; WOOD, R.E.; LIEBECQ, C. LIEBERMEISTER, H.; PARK C.R. Factors affecting glucose transport in heart muscle and erythrocytes. **Fed Proc.** 24: 1040-1045, 1965.
- MOORE, D.H.; RUSKA, H. Electron microscope study of mammalian cardiac muscle cells. **J. Biophys. & Biochem. Cytol.** 3: 261, 1957.
- NAJEED, S.A.; KHAN, I.A.; MOLNAR, J.; SOMBERG, J.C. Differential effect of glyburide (glibenclamide) and metformin on QT dispersion: A potential adenosine triphosphate sensitive K^+ channel effect. **Am J Cardiol**, 90: 1103-1106, 2002.
- NAVARATNAM, S.; KHATTER, J.C. Influence of the diabetic state on digitalis-induced cardiac arrhythmias in rat. **Arch. Int. Pharmacodyn** 301:151-164, 1989.
- NOMA, A. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. **Nature** 305:147-148, 1989.
- OKIN, P.M.; DEVEREUX, R.B.; LEE, E.T.; GALLOWAY, J.M.; HOWARD, B.V.; Strong heart study. Electrocardiographic repolarization complexity and abnormality predict all-cause

- and cardiovascular mortality in diabetes: the strong heart study. **Diabetes**, 53(2):434-40, 2004.
- OLSSON, J. LINDBERG, G.; GOTTSATER, M.; LINDWALL, K.; SJOSTRAND, A.; TISELL, A.; MELANDER, A. Increases mortality in type II diabetic patients using sulphonylurea and metformin in combination: a population-based observational study. **Diabetol.** 43: 558-560, 2000.
- PATANÈ, G.; PIRO, S.; RABUAZZO, A. M.; ANELLO, M.; VIGNERI, R. Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose. A direct metformin effect pancreatic β -cells. **Diabetes** 49: 735-740, 2000.
- PAULSON, D. The diabetic heart is more sensitive to ischemic injury. **Cardiol Res.** 34: 104-112, 1997
- PERRY, S.V. Relation between chemical and contractile function and structure of the skeletal muscle cell. **Physiol. Rev.** 36: 1, 1956.
- PERRY, S.V. Muscular contraction. In: Comparative Biochemistry, a Comprehensive Treatise, FLORKIN, M. & MASON, H. S. New York: Acad. Press, 245-360, 1960.
- QUAST, U.; STEPHAN, D.; BIEGER, S.; RUSS, U. The impact of ATP-sensitive K⁺ channel subtype selectivity of insulin secretagogues for the coronary vasculature and the myocardium. **Diabetes**, 53 Suppl 3: S156-64, 2004.
- RAJAKUMAR, V.; DONTI, GANG Y.E.; CHAODONG, W.U.; DONALD, A.; MCCLAIN, ALEX J.; LANGE AND PAUL, N. EPSTEIN Cardiac Expression of Kinase-deficient 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase Inhibits Glycolysis, Promotes Hypertrophy, Impairs Myocyte Function, and Reduces Insulin Sensitivity **J. Biol. Chem.**, 279 (46): 48085-48090, 2004.
- RANDLE, P. J. Regulatory interaction between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. **Diab Metab. Rev.** 14: 263-283, 1998.
- RICCIO, A.; DEL PRATO, S.; KREUTZENBERG, S. V.; TIENGO, A. Glucose and lipid metabolism in non insulin dependent diabetes. Effect of metformin. **Diabete Metab.** 17:180-184, 1991.
- ROCHA E SILVA, M. As bases fisiológicas da eletrocardiografia. In: AIRES, M. M. Fisiologia. 2. ed. Guanabara Koogan (RJ), 1999.

- RYOKE, T.; GU, Y.; IKEDA, Y.; MARTONE, M.; OH, S.S.; JEON, E.S.; KNOWLTON, K.U.; ROSS Jr, J. Apoptosis and oncosis in the early progression of left ventricular dysfunction in the cardiomyopathic hamster. **Basic Res. Cardiol.** 97:65-75, 2002.
- SCARPELLO, J.H.B.; HODGSON, E.; HOWLETT, H.C.S. Effect of metformin on bile salt circulation and intestinal motility in type 2 diabetes mellitus. **Diabet. Med.** 15: 651-6, 1998.
- SCHAEFER, S.; RAMASAMY, R. Glycogen utilization and ischemic injury in the isolated rat heart. **Cardiol. Res.**, 35: 90-98, 1997
- SCHNEIDER, W.C.; HOGEBOOM, G.H. Biochemistry of cellular particles. **Ann. Rev. Biochem.** 25: 201, 1956.
- SCHERER J. Contribution a l'étude de l'action d'alloxane sur le pancréas de cobaye. **Acta Anatomica**, 23: 350, 1955.
- SCHOTBORGH, C.E.; WILDE, A.A.M. Sulfonylurea derivatives in cardiovascular research and in cardiovascular patients. **Cardiol. Res.** 34: 73-80, 1997
- SHYNG, S.; FERRIGNI, T.; NICHOLS, C.G. Regulation of KATP channel activity by diazoxide and MgADP. Distinct functions of the two nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor. **J Gen Physiol.**, 110(6):643-54, 1997.
- SELWYN, A.P.; BRAUNWALD, E. In: HARRISON Tratado de Medicina Interna 8(244): 1456-1458, 1998.
- SHERWIN, R. S. In: GOLDMAN, L & AUSIELLO. Tratado de medicina interna. Ed. Elsevier, 22ª ed., vol II.: 1658, 2004.
- SHIMADA, T.; KAWAZATO, H.; YASUDA, A.; ONO, N.; SUEDA, K. Cytoarchitecture and intercalated disks of the working myocardium and the conduction system in the mammalian heart. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.** 280(2):940-51, 2004.
- SHIMONI, Y; SEVERSON, D.; EWART, H.S. Insulin resistance and the modulation of rat cardiac K(+) currents. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 279 (2): H639-49, 2000.
- SILVEIRA, I.F.; ARAUJO, L.R. Noções teórico-práticas de eletrocardiografia. Ed Revista Roche, Rio de Janeiro, 1960.
- SMITH, T.W. In CECIL: Tratado de medicina interna. Ed. Guanabara Koogan, 6(36):153-374, 1316-1347, 1992
- SPIRO, M.J.; McKIBBEN, J.M. The lipides of rat liver cell fractions. **J. Biol. Chem.** 219: 643, 1947.

- STEINER, D.F.; RAUDA, V.; WILLIAMS, R.H. Severe ketoacidosis in the alloxan diabetic rats. **Endocrinology**, 68:809, 1961.
- STITH, B.J.; WORONOFF, K.; WIERNSPERGER, N. Stimulation of the intracellular portion of the human insulin receptor by the antidiabetic drug metformin. **Biochem Pharmacol.** Feb 15;55(4):533-6, 1998.
- STUMVOLL, M.; NURJHAN, N.; PERRIELO, G.; DAILEY, G.; GERICH, J. E. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.** 31: 550-554, 1995.
- SUAREZ, G.A.; CLARK, V.M.; NORELL, J.E.; KOTTKE, T.E.; CALLAHAN, M.J.; O'BRIEN, P.C.; LOW, P.A.; DYCK, P.J. Sudden cardiac death in diabetes mellitus: risk factors in the Rochester diabetic neuropathy study. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 76(2):240-5, 2005.
- SUN, D.Q.; NGUYEN, N. DeGRADO, T.R.; SCHWAIGER, M.; BROSIUS, F.C. Ischemia induces translocation of the insulin responsive glucose transportador GLUT4 to the plasma membrane of cardiac myocytes. **Circulation**, 89: 793-798, 1994
- TAEGETMEYER, H.; KING, L.M.; JONES, B.E. Energy substrate metabolism, myocardial ischemia, and targets for pharmacotherapy. **Am. J. Cardiol.** 82: 54K-60K, 1998.
- TRINDER, R. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with alternative oxygen acceptor. **Ann. Clin. Biochem.** 6: 24, 1969.
- UKPDS GROUP, Effect of intensive blood glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes. **Lancet**, 352(12): 854-865, 1998.
- WATANABE, T.; ASHIKAGA, T.; NISHIZAKI, M.; YAMAWAKE, N.; ARITA M. Association of insulin with QTc dispersion. **Lancet**, 350: 1821–1822, 1997.
- WESTERGAARD, N.; MADSEN, P.; LUNDGREN, K. Characterization of glycerol uptake and glycerol kinase activity in rat hepatocytes cultured under different hormonal conditions. **Biochim Biophys Acta** 1402:261-268, 1998.
- WHEELER, T.J.; FELL, R.D.; HAUCK, M.A. Translocation of two glucose transporters in heart: effects of rotenone, uncouplers, workload, palmitate, insulin and anoxia. **Biochim. Biophys. Acta** 1196: 191-200, 1994.
- WITTENBERG, J.B.; WITTENBERG, B.A. Myoglobin function reassessed. **J Exp Biol.**, 206(12):2011-20, 2003.

- YOKOSHIKI, H.; SUNAGAWA, M.; SEKI, T.; SPERELAKIS, N. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac and vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.** 274: C25-C37, 1998.
- ZANINETTE, D.; GRECO-PEROTO, R. ASSIMACOPOULOS, J.F.; JEANRENAUD, B. Effects of insulin on glucose transport and glucose transporters in rat heart. **Biochem. J.** 250: 277-283, 1988.
- ZHENG, D.; McLEAN, P.; POHNERT, S.C.; KNIGHT, J.B.; OLSON, A.L.; WINDER, W.W.; DOHM, L. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. **J. Appl. Physiol.** 91: 1073-1083, 2001.
- ZORZANO, A.; SEVILLA, L. CAMPS, M.; BECKER, C.; MEYER, J.; KAMMERMEIER, H. MUÑOZ, P. GUMÀ, A. et al. Regulation of glucose transport and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes. **Am. J. Cardiol.** 80 (3A): 65^A-76^A, 1997.
- ZOU, M.H.; KIRKPATRICK, S.S.; DAVIS, B.J.; NELSON, J.S.; WILES, W.G.; SCHLATTNER, U.; NEUMANN, D.; BROWNLEE, M.; FREEMAN, M.R.; GOLDMAN, M.H. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. **J. Biol. Chem.**, 279 (42): 43940-43951, 2004.

Capítulo

8

APÊNDICE – TRABALHOS SUBMETIDOS

Partially Submitted Manuscripts			
Click on title to resume the submission.			
Manuscript ID	Title	Date Created	[delete]
No Manuscripts Found			

Submitted Manuscripts			
Click on title to view the submission.			
Manuscript ID	Title	Date Submitted	Processing Status & Journal Administrator
CEPP-05-0122	The Effects of Metformin on QT and QTc Interval Dispersion of Diabetic Rats	03 May 2005	With Editorial Office Georgina Nunn cepp@blackwellpublishingasia.com

The Effects of Metformin on QT and QTc Interval Dispersion of Diabetic Rats

Eunice Cristina da Silva Costa – Master Science

Antonio Ari Gonçalves - PhD

Miguel Arcanjo Áreas - PhD

Rafael Gustavo Birochi Morgabel - Graduated

State University of Campinas (SP), Biology Institute, Metabolism and Biophysic Lab, Brazil –

CP – 6109, Zip Code 13083-970

Phone – 55-019-3788-6196 Phone fax: 55-019 3788-6185

Correspondence e-mail: nice95@unicamp.br

ABSTRACT

Metformin, a pharmacological agent, is used to decrease blood glucose of type 2 diabetics, reduces gastrointestinal absorption of glucose, peripheral glucose uptake and gluconeogenesis. Besides these effects, metformin may influence the cardiovascular system by increasing plasma homocysteine levels, which accelerates the progression of vascular disease, predisposing heart failure or infarct. These and other physiological changes could be associated to an abnormal ECG, showing increase of QT interval and its dispersion (QTd). Those changes could be associated to a lower threshold for a malignant ventricular arrhythmias and sudden cardiac death. This study was designed to evaluate the effects of the treatment with high metformin doses on the ECG intervals: QT, QTc, QTd, and QTcd from alloxan diabetic rats. Male Wistar diabetic rats were treated by metformin (3.5, 30 and 74 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{b.w}$) during 30 days. A 6-lead ECG was recorded before, 15 and 30 days treatment. After 15 and 30 days, diabetic rats increased glycemia, QT interval and its derivatives. On the other hand, diabetic rats treated by low and intermediate doses of metformin (3.5 and 30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{b.w}$) during 30 days decreased glycemia. However, the group treated with the highest dose (74 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{b.w}$) failed to reduce glycemia. On the other hand, those groups treated by low and intermediate doses reduced the ECG intervals: QTc, and QTd, and QTcd in contrast to diabetic group that received the highest doses. The increased dispersion of QT intervals during treatment may be subjacent of risk of arrhythmias that predisposes to the occurrence of sudden cardiac death on humans.

Key words: Metformin, diabetes, ECG, heart

INTRODUCTION

Electrocardiography (ECG) is one of the most important methods to diagnose cardiopathies.¹ Extension and intensity of lesioned areas affects the propagation of action potential on the cardiac muscle, altering the ECG waves and the correspondent intervals. The increase of the QT interval is called syndrome of the QT long and is associated to an increased risk of arrhythmias and sudden death. This increase corresponds to an prolongation of the wave or an increase on the repolarization period.²

QT dispersion (QTd) and its corrected dispersion (QTcd) are calculated from ECG. These abnormalities in cardiac repolarization indicate a risk of ventricular tachycardia and sudden death. On other conditions, including ischaemic heart disease and congenital long QT syndrome.^{2,3} Type 1 diabetic patients present an abnormal ECG with an increased QT interval and its dispersion (QTd).

Studies showed that the prolonged of QTc interval is associated to the effects of diabetes.^{4,5,6} This increase could be related to metabolic changes, like an increase on the cardiac ventricle glycogen, which has been associated to diabetes severity.^{7,8}

Besides diabetes, some medicaments could alter the cardiac function. The biguanide metformin is an anti-hyperglycemic agent used to decrease the glycemia and consequently improve the metabolic profile. It reduces blood glucose levels through suppression of gluconeogenesis, since it stimulates peripheral glucose uptake by tissues, mainly skeletal muscles, in the presence of insulin and decreased absorption of glucose from the gastrointestinal tract. Some authors found no direct effects on β -cells. Metformin does not cause hypoglycemia, but reduces glycohemoglobin levels and improves blood lipid profile and fibrinolytic activity.^{9,10, 11,12}

Despite these beneficial effects, metformin presents disadvantages that may influence the cardiovascular system. Gastrointestinal disturbances, such as diarrhea is frequent and the intestinal absorption of B vitamins, especially folate, is impaired during chronic therapy. This deficiency may lead to increased plasmatic levels of homocysteine, which accelerates the progression of vascular disease due to adverse effects on platelets, clotting factors, and endothelium. It is recognized that an association between the levels of homocysteine and the overall mortality in patients with cardiovascular atherogenic disease.¹²

Under some circumstances, metformin could lead to lethal lactic acidosis, especially on patient with clinical conditions that predispose to this complication, such as heart failure or recent myocardial infarction.¹² Furthermore, we have observed that high doses, as recommended for some human patients, may be associated to a significant increase of glycogen stores on cardiac ventricle in comparison to control and alloxan diabetic rats treated with low doses. These changes of cardiac carbohydrate metabolism could lead to cardiac malfunction because this accumulation in conductive tissue is also likely to cause sinus and atrioventricular node dysfunction.¹³

The present study was design to investigate the effects of metformin doses on the QT and its derived intervals, QTc, QTd, and QTcd from ECG of alloxan diabetic rats.

METHODS

Animals

Males Wistar rats, 10 weeks old were employed. Rats were feed with commercial chow (Purina) and had free access to water. They were maintained in cages in groups of 4 or 5 rats under a 12 h light/dark photoperiodic cycle. Rats from treated groups received metformin diluted in drinking water (5, 6, 56 and 112 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) during 30 days. The volume of water ingested was measured and the intake was divided by individual body weight to estimate the

amount of metformin ingested, based to previous study. The institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation has approved the experimental protocols under number 262-1.

Groups

- 1) Control (C; n=5)
- 2) Diabetes (D; n=6)
- 3) Diabetes Metformin [$3.5 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ bw}$] (DM3.5; n=8)
- 4) Diabetes Metformin [$30 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ bw}$] (DM30; n=7)
- 5) Diabetes Metformin [$74 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ bw}$] (DM74; n=8)

Induction of Diabetes Mellitus

Diabetes was induced by alloxan (40 mg/kg/bw, i.v., pH 4.5) on anaesthetized rats after 24 h fast.^{14, 15.} In the following days rats were checked to detect glucose in urine, using commercial kit (Roche, Mannheim, Germany).

ECG record

Anaesthetized rats (Pentobarbital sodium, 40 mg/kg/b.w) was kept on supine position to record ECG during spontaneous respiration. The electrodes were connected to the channels of the ECG computer (Heart Ware System) with 6 standard limb leads (I, II, III, aVR, aVL and aVF), sensitivity 2N and speed 50 mm/second. QTc was measured by Bazget's formula: $Q-T/\sqrt{R-R}$. The dispersion of the QT and QTc was calculates by in absolute value, subtracting the shortest from the longest QT. This value was converted to percentage (%QTd) by correcting QTd for the shortest QT interval and multiplying by 100 ($\%QTd = [QT \text{ max} - Q_{tmin}/Q_{tmin}] \times 100$). The same operation was used to calculate QTcd.

Plasma Glucose Determination

Plasmatic glucose was measured by the glucose oxydase method (TRINDER, 1969), using commercial kit (Laborlab, São Paulo, SP-Brazil).

Statistics

Results are reported as mean $\pm$ SEM. Significance of data was evaluated by two-ways ANOVA, assuming $p < 0.05$ as the critical level. When required, differences between groups were assessed by TUKEY test.

RESULTS

Diabetes Effects

After 30 days, alloxan injection destroyed β -cell causing diabetes, increasing glycemia from $97.76 \pm 10.6 \text{ mg.dl}^{-1}$ to $562.8 \pm 60.6 \text{ mg.dl}^{-1}$, $p < 0.001$. No significant difference was recorded on the control group during the experimental period (figure 1).

Figure 2 A-B-C-D shows no difference among the control and diabetes groups for QT, QTc, QTd and QTcd intervals at the beginning of the experiments. After 15 days, the records revealed an increase on the intervals: QTc varied from $45.7 \pm 2.26 \text{ ms}$ to $53.2 \pm 3.24 \text{ ms}$ ($p < 0.05$) Its derivatives increased significantly, too: QTd from $9.68 \pm 2.1 \text{ ms}$ to $58.12 \pm 5.1 \text{ ms}$ ($p < 0.001$) and QTcd from $15.7 \pm 3.1 \text{ ms}$ to $86.9 \pm 4.4 \text{ ms}$ ($p < 0.001$). After 30 days, those parameters has changed again: QT from $39.8 \pm 0.7 \text{ ms}$ to $47.5 \pm 1.6 \text{ ms}$ ($p < 0.05$); QTc from 45.7 ± 2.26 to 63.1 ± 1.31 ($p < 0.001$); QTd from 9.68 ± 2.1 to 75.5 ± 7.1 ($p < 0.001$); QTcd from 15.7 ± 3.1 to 86.3 ± 8.4 ($p < 0.001$). During the same period, the control group did not changed.

Effects of the Treatment with Metformin

After 15 days, alloxan promoted an increase on glycemia of diabetic rats treated by low metformin doses from $122.7 \pm 4.41 \text{ mg.dl}^{-1}$ to $381.32 \pm 36.6 \text{ mg.dl}^{-1}$ ($p < 0.001$) and intermediate doses from $102.71 \pm 3.96 \text{ mg.dl}^{-1}$ to $360.85 \pm 13.56 \text{ mg.dl}^{-1}$ ($p < 0.001$).

However, after 30 days of treatment, glycemia did not change and was inferior to that of non-treated group (figure 1). On the contrary, high doses of metformin ($74 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ bw}$), failed to reduce glycemia during 15 or 30 days treatment. During the first period, glycemia rose from $102.16 \pm 1.42 \text{ mg.dl}^{-1}$ to $542.8 \pm 24.45 \text{ mg.dl}^{-1}$ ($p < 0.001$) and to $470.27 \pm 26.7 \text{ mg.dl}^{-1}$

($p < 0.001$), respectively, showing no favorable difference in relation to the non-treated diabetic group (figure 1).

No difference appears on the baseline parameters tested for the difference among the groups (Figures 2 A-B-C-D). After 15 days therapy, using low metformin doses, that is, $3.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ bw, QTd increased from 16.6 ± 1.07 ms to 42.0 ± 2.3 ms ($p < 0.01$) and QTcd increased from 19.4 ± 2.7 ms to 40.4 ± 5.0 ms ($p < 0.01$).

After 30 days of treatment, there was an increase from 35.7 ± 1.25 ms to 45.15 ± 1.56 ms ($p < 0.05$) on QT interval while the derivatives QTc, QTd and QTcd did not change after the 15th day of treatment (figures 2 A-B-C-D).

Similarly, the group treated during 15 days by intermediate metformin doses increased the QTd from 19.0 ± 2.32 ms to 48.8 ± 3.06 ms ($p < 0.01$) and QTcd interval increased from 19.9 ± 2.9 ms to 44.0 ± 2.6 ms ($p < 0.01$). However, these parameters did not change after the 15th day of treatment.

On the other hand, the treatment during 15 days with high metformin doses ($74 \mu\text{g.g}^{-1}$ b.w.) caused an increase on QT intervals (from 44.0 ± 1.53 ms to 52.9 ± 1.17 ms, $p < 0.05$). Similar changes were detected on its respective derivatives: QTc increased from 42.0 ± 2.04 ms to 53.4 ± 2.5 ms ($p < 0.05$). QTd varied from 16.4 ± 2.7 ms to 36.5 ± 3.2 ms ($p < 0.05$) and QTcd, from 16.1 ± 2.15 ms to 47.9 ± 2.67 ms ($p < 0.001$). However, at the 30th day of treatment, QTd still increased to 74.5 ± 4.4 ms ($p < 0.001$) and the QTcd changed to 71.9 ± 5.2 ms ($p < 0.001$) in a way similarly to the non-treated group diabetic (Figures 2 A-B-C-D).

DISCUSSION

The biguanide metformin is an anti-hyperglycemic employed for the treatment of type 2 diabetic. However, the metformin mechanism of action is until obscure. Studies showed that metformin activates AMPK in rat hepatocytes and skeletal muscle ¹⁶. This effect contributes on decrease of glycemia, improves the metabolic profile leading to the increase of glycogen in the liver and muscles and promotes benefits to blood lipid profile ^{17 18}. However, a study in vitro with β -cells showed that metformin, in high doses (1mM) and sustained exposure (24 h), activates the AMPK that could partially inhibit biosynthesis and release pathways in β -cells and cause apoptosis. This effect reduces their glucose responsiveness ¹⁹. And our results (figure 1) showed that metformin, on the highest dose, equivalent to recommended for human patients ($74 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ bw}$) did not decrease the glycemia levels in diabetic rats, indicating that metformin reduced the glucose responsiveness.

Despite of, these could be due too therapeutic doses of metformin stimulates tyrosine kinase activity of the β subunit of the intracellular portion receptor. However, high doses of metformin inhibits the tyrosine kinase activity and consequently, inhibits insulin action.²⁰

Low concentrations of metformin can induce AMPK-mediated alterations in β -cells without impaired its function ^{17, 18}. In our study, low ($3.5 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ bw}$) and intermediates ($30 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ bw}$) concentrations of metformin reduced significantly the glycemia when compared with diabetic rats but the treatment time, 15 or 30 days, made no difference on this effect. The glycemic reduction induced by low doses of metformin in the treatment time proposed was not enough to normalize the glycemic levels.

The hyperglycemia is associated to increase of the glycogen storage in ventricle ⁷. The changes of cardiac carbohydrate metabolism could lead to cardiac malfunction ²¹. Preliminary results (no publicated) has showed that high metformin doses induced a high storage of

glycogen in the heart ventricle of alloxan diabetic rats while low doses of metformin induced small increase of ventricle glycogen.

Persistent activity of AMP kinase, like occurs by treatment with metformin, could promotes mutation in the PRKAG2, the gene for the $\gamma 2$ regulatory subunit of AMP-activated protein kinase. These mutation should increase glucose uptake by stimulin translocation of the glucose transporter GLUT-4 to the plasma membrane, and increase hexokinase activity, leading to glycogen accumulation. Glycogen accumulation in conductive tissue is also likely to cause sinus and atrioventricular node dysfunction¹³.

Diabetes and pharmacological agents could alter the cardiac function promoting changes on the membrane of cardiomyocytes, affecting its enzymatic activity, the receptors function and the metabolism related to the ionic transport.^{22 23}

Diabetes causes changes in the MAP kinase and glucose transporters. The enhancement of K^+ currents in ventricular cells depend of MAP kinase activation and reflects the synthesis of new channels.

The decrease of insulin on diabetic group, probably leads to a decrease on epicardial K^+ outflow, which promotes an increase on the action potential duration. Furthermore, the deficient insulin secretion could decrease the activity of the Na^+/K^+ pump, which may be related to the decrease of energetic substrates.⁴

The insulin decrease promotes changes in blood flow and in cardiac function, affecting the dispersion of ventricular action potential repolarization, called QT dispersion.

Figure 2 (B, C and D) show that QTc interval, QTd and the QTcd increased on alloxanized diabetic rats. This may be related to the retard on cardiac action potential depolarization and repolarization. Also, the recovery of the diabetic heart could be slowed after an ischemia.²⁴

The increased QTc interval corresponds to an increased duration of the ventricular action potential and could be associated to the alterations on depolarization and repolarization phases ^{4,25}

The QT dispersion (QTd) is associated to the repolarization time, too.¹⁹ The increase on QTd causes congestive heart failure, the long QT syndrome, ischaemic heart disease, myocardial infarction, left ventricular hypertrophy, hypertrophic cardiomyopathy, chronic renal failure, arrhythmias and sudden cardiac death. ^{6,26,27, 28}

In the ECG records we showed that metformin in high doses ($74 \mu\text{g.g}^{-1}$) leads to an increase on QT and its derivatives (QTd, QTc, QTcd), 15 or 30 days later (Fig 2 A-D). The high dose and the sustained exposure of metformin probably increased the activity of the AMPK, promoting increase of glycogen storage (no published data) that caused dysfunction in conductive tissue. The prolongation or increase of the repolarization period (QT long syndrome) quantify the degree of myocardial repolarization non-homogeneity have been associated with serious arrhythmias and sudden death ^{2,3}

However, low and intermediates metformin doses increased the QTd and QTcd of rats treated during 15 days. After 30 days, we did not find any important increase of those parameters, since no significant changes were revealed by the analysis of those records and its derivatives, QT and QTc intervals, which did not change (Fig. 2 A-D). These results showed that the treatment improved the ventricular electric conduction and suggested that metformin in low doses activates the AMPK without causing dysfunction in the glucose metabolism.

The toxic response to high metformin doses could be related to a metabolic effect that alters ionic conductivity and decreases the Na^+/K^+ pump activity. The present results suggest

that low and intermediate doses of metformin may have beneficial protection for the cardiac muscle.

Acknowledgment: We gratefully acknowledge the assistance of the CNPq.

REFERENCES

1. SGARBOSSA EB, BAROLD SS, PINSKI SL, WAGNER GS, PAHLM O. Twelve-lead electrocardiogram: The advantages of an elderly frontal lead display including lead-AVR. *J Eletrocardiol* 2004; Jul 37(3): 141-147.
2. ARILDSEN HA, MAY O, CHRISTIANSEN EH, DAMSGAARD EM. Increased QT dispersion in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Cardiol* 1999; 71: 235-242.
3. HELLER SR. Abnormalities of the electrocardiogram during hypoglycaemia: the cause of the dead in bed syndrome? *Int J Clin Pract* 2002; Suppl Jul;(129):27-32.
4. SHIMONI Y, SEVERSON D, GILES W. Thyroid status and diabetes modulate regional differences in potassium currents in rat ventricle. *J Physiol* 1995; 1;488: 673-88.
5. DEKKER JM, FESKENS EJ, SCHOUTEN EG, KLOOTWIJK P, POOL J, KROMHOUT D. QTc duration is associated with levels of insulin and glucose intolerance. *Diabetes* 1996; 45:376:380.
6. VEGLIO M, BORRA M, STEVENS LK, FULLER JH, PERIN PC. The relation between QTc interval prolongation and diabetic complications. The EURODIAB IDDM Complication Study Group. *Diabetol*. 1999; 42:68-95.
7. HIGUCHI M, MIYAGI K, NAKASONE J & SAKANASHI M. Role of high glycogen in underperfused diabetic rat hearts with added norepinephrine. *J Cardiol Pharm* 1995; 26: 899-907.
8. TOSAKI A, ENGELMAN DT, ENGELMAN RM, DAS DK.. The evolution of diabetic response to ischemia/reperfusion and preconditioning in isolated working rat hearts. *Basic Res Cardiol* 1995; 31:526-536.

9. RICCIO A, DEL PRATO S, KREUTZENBERG SV, TIENGO A. Glucose and lipid metabolism in non insulin dependent diabetes. Effect of metformin. *Diabete Metab.* 1991; 17:180-184.
10. STUMVOLL M, NURJHAN N, PERRIELO G, DAILEY G, GERICH JE. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1995; 31: 550-554.
11. BAILEY CJ. Insulin resistance and antidiabetic drugs. *Biochemical Pharmacology* 1999; 58: 1511-1520.
12. FISMAN EZ, TENENBAUM A, MOTRO M, ADLER Y. Oral antidiabetic therapy in patients with heart disease. *Herz* 2004; 29: 290-298.
13. ARAD M, BENSON DW, PEREZ-ATAYDE AR, McKENNA WJ, SPARKS EA, KANTER RJ, McGARRY K, SEIDMAN JG. Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 2002; 109(3):357-62.
14. STEINER DF, RAUDA V, WILLIAMS RH. Severe ketoacidosis in the alloxan diabetic rats. *Endocrinology*, 1961; 68:809.
15. SCHERER J. Contribution a l'étude l'action d'alloxane sur le pancreas de cobaye. *Acta Anatomica*, 1955. 23: 350.
16. ZOU MH, KIRKPATRICK SS, DAVIS BJ, NELSON JS, WILES WG, SCHLATTNER U, NEUMANN D, BROWNLEE M, FREEMAN MR, GOLDMAN MH. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. *J. Biol. Chemistry* 2004; 279 (42): 43940-43951.

- 17.** GONÇALVES AA, da SILVA EC, BRITO IJL, da SILVA CA, WIERNSPERGER N. Metformin interacts with training to lower glycemia and to increase glycogen stores in diabetic rats. *Diabetologia* 1999; 42 (Suppl) 52A
- 18.** LECRERE I, WOLTERSDORF WW, da SILVA XAVIER G, ROWE RL, CROSS SE, KORBUTT GS, RAJOTTE RV, SMITH R, RUTTER GA. Metformin, but not leptin, regulates AMP-activated protein kinase in pancreatic islets: impact on glucose-stimulated insulin secretion. *Am J. Physiol. Endocrinol Metab* 2004; 286: E1023-E1031.
- 19.** KEFAS BA, CAI Y, KERCKHOFS K, LING Z, MARTENS G, HEIMBERG H, PIPELEERS D, VAN de CASTEELE M. Metformin-induced stimulation of AMP-activate protein kinase in β -cells impairs their glucose responsiveness and can lead to apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2004; 1;68(3):409-16.
- 20.** STITH BJ, WORONOFF K, WIERNSPERGER N. Stimulation of the intracellular portion of the human insulin receptor by the antidiabetic drug metformin. *Biochem Pharmacol.* 1998; Feb 15;55(4):533-6.
- 21.** HIGUCHI M, IKEMA S, MATSUZAKI T, HIRAYAMA K, SAKANASHI M. Effects of norepinephrine on hypoperfusion-reperfusion injuries in hearts isolated from normal and diabetic rats. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1991; 23: 137-148.
- 22.** NAVARATNAM S, KHATTER JC Influence of the diabetic state on digitalis-induced cardiac arrhythmias in rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1989; 301:151-164.
- 23.** SHIMONI Y, SEVERSON D, EWART HS. Insulin resistance and the modulation of rat cardiac K(+) currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279 (2): H639-49.

- 24.**FEUVRAY D & LOPASCHUK GD. Controversies on the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury: the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury is decreased. Cardiovasc Res 1997; 34: 113-120.
- 25.**SHIMONI Y. Hormonal control of cardiac ion channels and transporters. Prog Bioph & Moll Biol, 1999; 72: 67-108.
- 26.**SCHWARTZ PJ & WOLF S. QT interval prolongation as predictor of sudden death in patients with myocardial infarction. Circulation 1978; 57: 1074-1077.
- 27.**ALGRA A., TIJSSEN JG; ROELANDT JR, POOL J, LUBSEN J. QTc prolongation measured by standard 12-lead electrocardiograph is an independent risk factor for sudden death due cardiac arrest. Circulation 1991; 83: 1888-1894.
- 28.**NAJEED SA, KHAN IA, MOLNAR J, SOMBERG JC. Differential effect of glyburide (glibenclamide) and metformin on QT dispersion: A potential adenosine triphosphate sensitive K⁺ channel effect. Am J Cardiol 2002; 90: 1103-1106.

Figure 1:

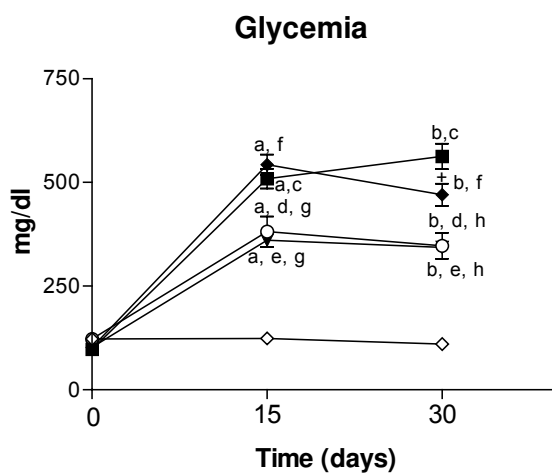


Figure 1: Changes in glycemia after alloxan induction and after 15 and 30 days of metformin treatment.

- ◇ Control
- Diabetes
- DM 3.5
- ▼ DM 30
- ◆ DM 74

a $p < 0.05$ vs control-15 days; b $p < 0.05$ vs control-30 days; c $p < 0.05$ vs diabetes-0; d $p < 0.05$ vs DM-3.5 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{bw}^{-1}$ -0; e $p < 0.05$ vs DM-30 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{bw}^{-1}$ -0; f $p < 0.05$ vs DM-74-0 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{bw}^{-1}$; g $p < 0.05$ vs diabetes-15 days; h $p < 0.05$ vs diabetes-30 days.

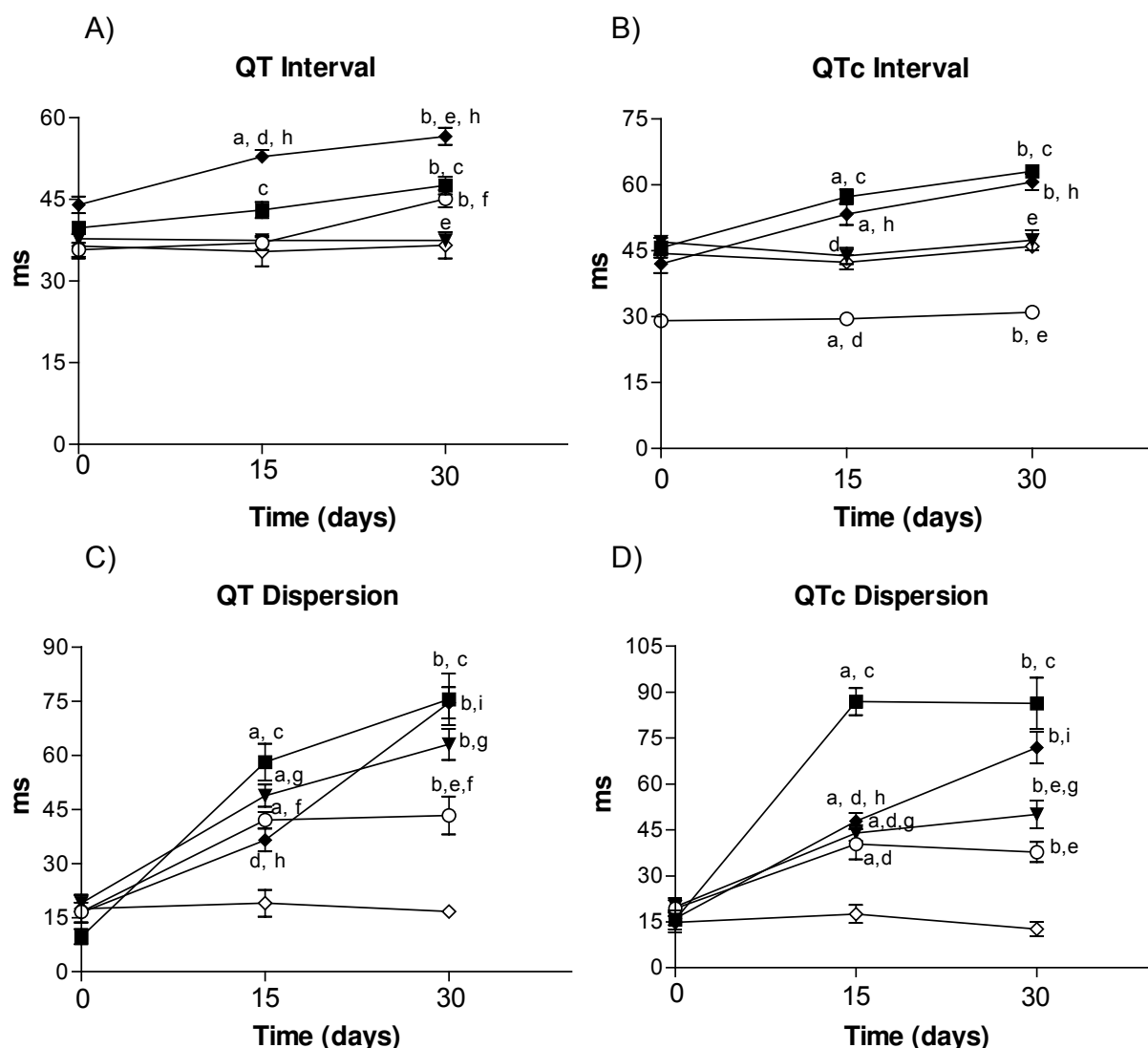


Figura 2 A, B, C, D: Changes in QT, QTc, QTd, QTcd intervals after 15 and 30 days of treatment with metformin.

◇ Control
 ■ Diabetes
 ○ DM 3.5
 ▼ DM 30
 ◆ DM 74

a $p < 0.05$ vs control-15 days; b $p < 0.05$ vs control-30 days; c $p < 0.05$ vs diabetes-0; d $p < 0.05$ vs diabetes-15 days; e $p < 0.05$ vs diabetes 30-days; f $p < 0.05$ vs DM-3.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ bw-0; g $p < 0.05$ vs DM-30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ bw - 0; h $p < 0.05$ vs DM-74 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ bw -0; i $p < 0.05$ vs DM 74 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ bw - 15 days.

Dashboard

- To submit a new manuscript, click on the "Submit a Manuscript" link above.
- Clicking on the various manuscript status links under "My Manuscripts" will display a list of all the manuscripts in that status at the bottom of the screen.
- To continue a submission already in progress, click the "Continue Submission" link in the "Unsubmitted Manuscripts" list.

Submitted Manuscripts

Manuscript ID	Title	Date Created	Date Submitted	Status
MP-00125-05	High doses of metformin decrease contractile force underperfused diabetic rat hearts with added norepinephrine. [View Manuscript]	03-May-2005	03-May-2005	Awaiting Editorial Office Processing

High doses of metformin decrease contractile force underperfused diabetic rat hearts
with added norepinephrine.

Eunice Cristina da Silva Costa ¹

Antonio Ari Gonçalves ¹

Heitor Moreno Júnior ²

Valéria Cristina Teixeira Frigato ²

Miguel Arcanjo Áreas ¹

¹ Department of Physiology and Biophysics, Biology Institute, ² Department of Pharmacology,
Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, Zip
Code 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil

Phone – 55-019-3788-6196 Phone fax: 55-019 3788-6185000

e-mail: nice95@unicamp.br

ABSTRACT

Metformin is anti-hyperglycemic used to decrease glycemia improving the metabolic profile. However, metformin may influence the cardiovascular system by increased heart glycogen content suggesting damage in contractile force. Using a Langendorff apparatus, ischemia was provoked in the hearts by perfusion of norepinephrine during 1h and the left ventricular pressure (LVP), DP/Dt^+ and DP/Dt^- (mmHg) was evaluated in alloxanized diabetic rats treated with metformin (DM) (3.5, 30 and 74 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ b.w) by 30 days. The response to ischemia from DM3.5 and DM30 groups, did not differ from control. DM74 group developed an inferior maximal LVP, DP/Dt^+ and DP/Dt^- . The return of this parameters was faster than those recorded from another groups. Hearts of diabetic rats treated with high metformin doses may turn the ventricles susceptible to the effects of ischemia, causing prejudice to cardiac work. These effects could be associated to the increased glycogen content observed in all diabetics groups.

Key words: Metformin, diabetes, langendorff, cardiac ischemia

1. Introduction

Diabetes is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia, due to protein, lipids and carbohydrates metabolism alterations. These changes increase the tendency to cardiovascular disease and neuropathy development, which are one of the biggest causes of death (Paulson, 1996).

The lipid metabolism alterations increase the risk arterioscleroses and others cardiovascular diseases, such as, hypertension and ischemia (Boden, 1997). Also, the changes of cardiac carbohydrate metabolism could lead to cardiac malfunction (Higuchi, 1991). The increase of glycogen storage in ventricle may be associated to diabetes gravity (Higuchi et al, 1995). Although the increase of glycogen could help myocardium metabolism during a short duration ischemia. When it is prolonged, it causes damage to the myocardium because the glycogen is quickly depleted, because of the increased activity of the glycogen phosphorylase (Higuchi et al, 1995).

The anti-hyperglycemic biguanide metformin, which is indicated for type 2 diabetics, contributes to decrease glycemia, improving the metabolic profile of lipid metabolism and decrease the insulin resistance in skeletal muscles and in liver. It also increases the content of glycogen in liver (Gonçalves et al, 1999). The mechanisms of action of the metformin are the exit suppressed of the hepatic glucose, increase of the glucose uptake by muscle cells and inhibits the lipolysis (Riccio et al, 1991; Stumvoll et al, 1995; Bailey, 1999; Giannarelli et al., 2003). It was suggested that metformin has a role in cardiovascular muscle protection.

Preliminary results (unpublished data) has showed that high metformin doses, equivalent to that recommended as maximum for humans, induced a high storage of

glycogen in the heart ventricle of alloxan diabetic rats. Gastrointestinal disturbances such as diarrhea are frequent, and the intestinal absorption of B vitamins, especially folate, is impaired during chronic therapy. This deficiency may lead to increased plasma homocysteine levels that, in turn, accelerates the progression of vascular disease due to adverse effects on platelets, clotting factors, and endothelium. It is recognized that an association between the levels of homocysteine and the overall mortality in patients with cardiovascular atherogenic disease. In addition, metformin may lead to lethal lactic acidosis, especially in patients with clinical conditions that predispose to this complication, such as heart failure or recent myocardial infarction (Fisman, 2004). However, we found evidences that low doses of metformin induced small increase of ventricle glycogen. It scenes that metabolic changes involving the glycogen storage must be considered when looking for the response of the cardiac muscle during an ischemia.

The aim of the present study was evaluated the effects of low and high doses of metformin on cardiac muscle function in alloxan diabetic rats during a provoked heart ischemia, since the ischaemic heart disease is the major cause of death in diabetic patients. Parameters as left ventricular systolic pressure and in the rate of pressure changes were measured during a provoked ischemia on isolated hearts and remained glycogen evaluated after a period of ischemia.

2. Methods

2.1. Animals

In this work, males Wistar rats, 10 weeks old were employed. They were feed with commercial chow (Purina) and had free access to water. They were maintained in cages in groups of 4 or 5 rats in a photoperiodic cycle (12 h light/dark).

The treated groups received metformin (Lipha, Lion, France) diluted in the drinking water (5,6, 56 and 112 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) during 28 days. The volume of water ingested was measured and the intake was divided by body weight to estimate the amount of metformin ingested, according to previous study. The institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation has approved the experimental protocols under number 262-1.

2.2. Groups

- 1) Control
- 2) Diabetes
- 3) Diabetes Metformin [$3,5 \mu\text{g}.\text{g}^{-1} \text{ bw}$]
- 4) Diabetes Metformin [$30 \mu\text{g}.\text{g}^{-1} \text{ bw}$]
- 5) Diabetes Metformin [$74 \mu\text{g}.\text{g}^{-1} \text{ bw}$]

2.3. Induction of Diabetes Mellitus

Diabetes was induced by alloxan (40 mg/kg/bw, i.v., pH 4,5) in anesthetized 24 h fast rats. In the following days the diabetes establishment was checked by the presence of glucose in the urine.

2.4. Surgical Procedure

Concluded the period of treatment, the rats were anesthetized with Phenobarbital and the hearts were removed after thoracotomy, and immediately transferred to the Langendorff apparatus and fixed.

After one small incision on the left atrium, one latex balloon was inserted in the left ventricle across a cannula (PE 160), which was coupled to a pressure transducer (Ugo Basile). The pressure and heart rate was amplified and recorded in a computer. The initial diastolic pressure was established between 0 and 10 mmHg and the perfusion during experiment was of 65 mmHg, at 37° C.

2.5. Isolated Heart by Langendorff Method

The performance of the cardiac muscle, the heart was studied during 1 h of perfusion in a Langendorff system apparatus. In this system, the cannula was inserted in the aorta and the perfusion pressure for rats is between 60 and 70 mmHg. The heart was around 200 bpm. The solution to perfuse the isolated heart was the Krebs-Henseleit solution (NaCl 188 M; Na

HCO₃ 25 M, glucose 11,1 M, KCL 4,7 M, KH₂PO₄ 1,2 M, MgSO₄7H₂O 1,17 M e CaCl₂6H₂O 2,5 M gassed with O₂:CO₂ (95:5%).

2.6. Perfusion Protocol – Ischemia

After 10 min of perfusion with Krebs solution (control period), ischemia was induced by the perfusion of a Krebs solution 2 ml/min/g containing 10⁻⁶ M norepinephrine (NE), during 60 min. At the end, hearts were frozen in liquid nitrogen and stored for the measurement of the remnant glycogen.

2.7. Glycogen Determination

Ventricle samples were digested in hot 30% KOH. Glycogen was precipitated in 2 steps with ethanol and submitted to acidic hydrolysis in the presence of hot phenol (Lo et al, 1970). Glycogen content was expressed as glucose units (mg.100 mg⁻¹ of wet tissue), read at 490 nm.

2.8. Plasma Glucose Determination

Glucose was measured by the glucose oxydase method (Trinder, 1969), using commercial kit (Laborlab, São Paulo, SP, Brazil).

2.9. Statistics

Results are reported as mean $\pm$ SEM. Significance of data was evaluated by two-ways ANOVA, assuming $P < 0,05$ as the critical level. When required, differences between groups were assessed by Tukey test.

3. RESULTS

3.1. Diabetes Effects

Alloxan diabetic rats increased glycemia from 117.13 ± 5.45 to 530.7 ± 38.4 ($n = 7$) when compared to control rats. The ventricle glycogen content (fig.2) doubled in diabetic rats, reaching 0.38 ± 0.07 , in comparison to while it was 0.19 ± 0.007 in the control group.

When subjected to ischemia, diabetic rats showed a great susceptibility to this stress, as the presented in the figs 3-5.

Figure 3 A presents the basal systolic ventricle pressure developed by the diabetic rat heart. This was 31% lower of that showed by the control group ($P < 0,05$). This figure also shows that the pressure peak and the pressure maintained during the perfusion were inferior in the diabetic heart rats than in the control rats. After norepinephrine perfusion, the heart from diabetic rat developed a systolic ventricle peak pressure 33% inferior to that of the control group. At the end of perfusion (1 hour) the initial ventricle systolic pressure was recovered in both groups but, the differences between them recorded pressures maintained similar slot was obtained during the analysis of the DP/Dt^+ and the DP/Dt^- showed similar behavior and is plotted in figs 3 B and C, respectively.

At the end of NE perfusion, glycogen content in the hearts was very low not differing from the control group (0.1 ± 0.007 vs 0.11 ± 0.01 ; fig 6). However, the diabetic rats showed a high utilization of ventricle glycogen in relation to the control group.

3.2 Metformin Treatment Effect

Low and intermediates metformin doses (3.5 and $30 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ b.w}$) decreased glycemia in diabetic rats from 530.7 ± 38.4 to 409.4 ± 18 and 417.9 ± 13.02 , respectively (fig 1). However, treating them with higher doses ($74 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ b.w}$) did not reduce glycemia (530.7 ± 38.4 in diabetic vs 474.5 ± 26.2 ; $p > 0,05$).

The treatment of diabetic rats with low doses of metformin increased less the ventricle glycogen (0.36 ± 0.02) as compared to the intermediate and the higher doses (0.50 ± 0.05 and 0.67 ± 0.045 , respectively, Fig 2).

When subjected to ischemia, the hearts of diabetic rats treated with low and intermediate metformin doses were better protected from the ischaemic effect than those treated with the biggest dose, as shown in the figs 3 A, B and C. Also, it shows that hearts from diabetic rats treated with low and intermediate metformin doses developed a basal systolic ventricle pressure respectively 83% e 53% higher than that of diabetic rats heart without treatment. However, those rats treated with the highest metformin dose developed the lowest pressure not differing from the non-treated group.

After norepinephrine perfusion, hearts from the diabetic treated rats with low and intermediate doses of metformin developed a pressure peak ventricle 64% and 81 % higher than that showed by the non-treated group. On the other way, the rats treated with the highest metformin dose developed the lowest ventricle systolic pressure, not differing from the non-

treated diabetic group. At the end of the perfusion period, the initial systolic pressures were restored in all groups. However, the differences among the initial pressures remained.

Similar pattern of changes were obtained during the analysis of correspondents curve derivatives (fig 3 B and C).

The analysis of the glycogen reserves after the perfusion showed that NE depleted glycogen from hearts diabetic (Figs 2 and 4). The group treated with the highest metformin dose showed the lowest glycogen content after the 60 min of perfusion.

4. Discussion

Alterations of lipidic metabolism in diabetics increase the risk of the development of atheroscleroses and another cardiovascular diseases (Boden, 1997). These diseases could occur too by changes in the carbohydrates metabolism of the cardiac muscle (Higuchi et al, 1991).

Observations of our group demonstrated that the glycogen increased in the ventricle of aloxanic rats (Fig. 2). Another groups (Higuchi et al., 1995; Feuvray and Lopaschuk, 1997; Paulson, 1997) evidenced increase of the glycogen in the ventricle of diabetic rats by streptozotocin, and suggested that this fact could to turn the heart resistant to cardiac ischemia.

The increase of the glycogen in the ventricle by transport of the glucose in cardiomyocytes is regulated by many factors than insulin. The GLUT 4 is the most abundant glucose transported in the heart. The AMPK (protein kinase activated) increase the GLUT4 transcription in answer to contractile force (Zheng et al., 2001) helping in the glucose transport. However, the contraction stimulates the glucose transport in cardiomyocytes, too

(Kolter et al., 1992; Wheeler et al., 1994). Moreover, the nervous system regulates the glucose transport by sympathetic enervation that promotes the liberation of catecholamines and serotonin which promotes the GLUT4 and GLUT1 to the membrane (Fischer, 1996; Fischer et al., 1996; Zorzano et al., 1997). The effects of the catecholamine are independent of the insulin presence (Fischer et al., 1996).

The increase of the glycogen storage in the ventricle is associated to the severity degree and the duration of the diabetes. These increase to turn the heart more susceptible to the effects of the ischemia (Higuchi et al., 1995). Higuchi et al. (1995) observed that the ischemia of short duration, in isolated heart of diabetic rats (Langendorff preparation), the glycogen was preserved. However, in ischemia of long duration, the glycogen was quickly depleted decreasing the energy utilized by the Na^+/K^+ pump. Conclude which the metabolic modification could impair the contractile force and the recuperation of the electric state evoking the cardiac stiffness that occurs during ischemia.

According with Higuchi et al. (1995), this fast depletion of the glycogen content is consequence of the increase of the glycogen phosphorylase activity in the cardiac muscle in answer to epinephrine and to norepinephrine.

We have equivalent results in our study (Fig 3 A), having decrease of the pressure answer in isolated heart of diabetic rats which indicates decrease of the contractile force under ischemia of long duration (1h). The results also show the fast depletion of the glycogen storage in the heart of these rats.

Pharmacological agents could alter the cardiac function, too. Its promotes changes in the cardiomyocytes membrane, affecting its enzymatic activity, receptors function and the metabolism related to the ionic transport in diabetic (Navaratnam and Khatter, 1989).

The biguanide metformin is an anti-hyperglycemic utilized in the diabetic type 2 treatment, contributing to the decrease of the glycemia and improves the metabolic profile increasing the glycogen storage in the liver and muscle (Bailey, 1999).

Our results showed that metformin, in high doses, like that recommended to humans patient, didn't decrease the glycemia of diabetic rats, like demonstrated in the figure 1. However in low doses were efficient to decrease the glycemia.

Therapeutic doses of the metformin stimulate the tyrosine kinase activity of the subunit β of the intracellular portion of the insulin receptor. However, in high doses, metformin inhibits the insulin action (Stith et al., 1998).

Moreover, metformin in high doses promotes a big increase of glycogen content in the ventricle of the diabetic rats, while in rats treated with low doses, this increase was few (Fig 2).

Our results, of the pressure answer of isolated heart under ischemia in presence of norepinephrine, shows that high doses of metformin resulted in lesser maximum systolic pressure, dP/dt^+ and dP/dt^- . These results indicate that had decrease of the contractile force, suggesting that the cardiac muscle is more susceptible to the effects of the ischemia in this experimental condition. These decreases of the dP/dt^+ and dP/dt^- in answer to norepinephrine suggest decrease in the systolic volume and consequently decrease of the cardiac debit (Moreno JR et al., 1996). The toxic answer to high doses of metformin could be related to metabolic effects that alter the ionic conductivity impairing the energy required to the Na^+/K^+ pump (Navaratnam and Khatter, 1989) and/or possibly damage in the tissue cardiac caused by the diabetes (Moreno JR et al., 1996, 1997) that we are investigate in next study. Moreover, these results could be explained too, by the inhibition of the lipolysis by the metformin, that is the main energy source of the heart. These impaired was confirmed by

depletion of the glycogen content stored in the ventricle, contributing to the state of cardiac stiffness. In low and intermediate concentrations had protection of the cardiac muscle by metformin, confirmed by high peak and slow fall of the systolic pressure, $dP/dt+$ and $dP/dt-$, improving the cardiac function (systolic volume and cardiac debit) that was altered in diabetic rats without treatment.

Acknowledgements

This work was supported by (in part) The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

- Bailey, C.J., 1999. Insulin resistance and antidiabetic drugs. *Bioch. Pharmacol.* 58, 1511-1520.
- Boden, G., 1997. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*, 46, 3-10.
- Feuvray, D., Lopaschuk, G.D., 1997. Controversies on the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury: the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury is decreased. *Cardiol. Res.*, 34, 113-120,.
- Fischer, Y., Thomas, J., Holman, G.D., Rose, H, Kammermeier, H., 1996. Contraction-independent effects of catecholamines on glucose transport in isolated rat cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* 270, C1204-C1210,.

- Fischer, Y., Kamp, J., Thomas, J., Pöpping, S., Rose, H., Carpené, C., Kammermeier, H., 1996. Signals mediating stimulation of cardiomyocyte glucose transport by the α -adrenergic agonist phenylephrine. *Am. J. Physiol.* 270, C1211-C1220.
- Fisman E.Z., Tenenbaum A., Motro M., Adler Y., 2004. Oral antidiabetic therapy in patients with heart disease. *Herz*, 29, 290-298.
- Giannarelli, R., Aragona, M., Coppelli, A., Del Prato, S., 2003. Reducing insulin resistance with metformin. *Diabetes Metab.*, 29, 6S28.
- Gonçalves, A.A., da Silva, E.C., Brito, I.J.L., da Silva, C.A., Wiernsperger, N., 1999. Metformin interacts with training to lower glycemia and to increase glycogen stores in diabetic rats. *Diabetologia*, 42 (Suppl) 52A.
- Higuchi, M., Ikema, S., Matsuzaki, T., Hirayama, K., Sakanashi, M., 1991. Effects of norepinephrine on hypoperfusion-reperfusion injuries in hearts isolated from normal and diabetic rats. *J. Mol. Cell Cardiol.* 23, 137-148.
- Higuchi, M., Miyagi, K., Nakasone, J., Sakanashi, M., 1995. Role of high glycogen in underperfused diabetic rat hearts with added norepinephrine. *J. Cardiol. Pharm.* 26, 899-907.
- Kolter, T., Uphues, I., Wicielihaus, A., Reinauer, H., Eckel, J., 1992. Contraction-induced translocation of the glucose transporter GLUT4 in isolated ventricular cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 189, 1207-1214.
- Lo Siu, J.C.R., Rousseau, J.C., Taylor, A.W., 1970. Determination of glycogen in small tissue samples. *J. Appl. Physiol.*, 28, 234-236.
- Moreno JR, H., Metze, K., Bento, A.C., Antunes, E., de Nucci, G., 1996. Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. *Basic Res Cardiol.* 91, 248-255.

- Moreno, JR. H., Nathan, L.P., Metze, K., Costa, S.K.P., Antunes, E. Hyslop, S.; Zatz, R.; Nucci, G., 1997. Non-specific inhibitors of nitric oxide synthase cause myocardial necrosis in the rat. *Clin. and experim. pharmacol. and physiol*, 24, 349-352.
- Navaratnam, S., Khatter, J.C., 1989. Influence of the diabetic state on digitalis-induced cardiac arrhythmias in rat. *Arch. Int. Pharmacodyn*, 301:151-164.
- Paulson, D., 1997. The diabetic heart is more sensitive to ischemic injury. *Cardiol Res.* 34, 104-112.
- Riccio, A., Del Prato, S., Kreutzenberg, S.V., TIENGO, A. 1991. Glucose and lipid metabolism in non insulin dependent diabetes. Effect of metformin. *Diab & Metab.* 17,180-184.
- Stith, B.J, Woronoff, K., Wiernsperger N. 1998. Stimulation of the intracellular portion of the human insulin receptor by the antidiabetic drug metformin. *Biochem Pharmacol.*; Feb 15, 55(4):533-6.
- Stumvoll, M., Nurjhan, N., Perrielo, G., Dailey, G., Gerich, J.E. 1995. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 31, 550-554.
- Trinder, R., 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 6, 24.
- Wheeler, T.J., Fell, R.D., Hauck, M.A. 1994. Translocation of two glucose transporters in heart: effects of rotenone, uncouplers, workload, palmitate, insulin and anoxia. *Biochim. Biophys. Acta* 1196, 191-200.
- Zheng, D., Mclean, P., Pohnert, S.C., Knight, J.B., Olson, A.L., Winder, W.W., Dohm, L. 2001. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. *J. Appl. Physiol.* 91, 1073-1083.
- Zorzano, A.; Sevilla, L. Camps, M.; Becker, C.; Meyer, J.; Kammermeier, H. Muñoz, P. Gumà, A. et al. 1997. Regulation of glucose transport and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes. *Am. J. Cardiol.* 80, (3A): 65^A-76^A.

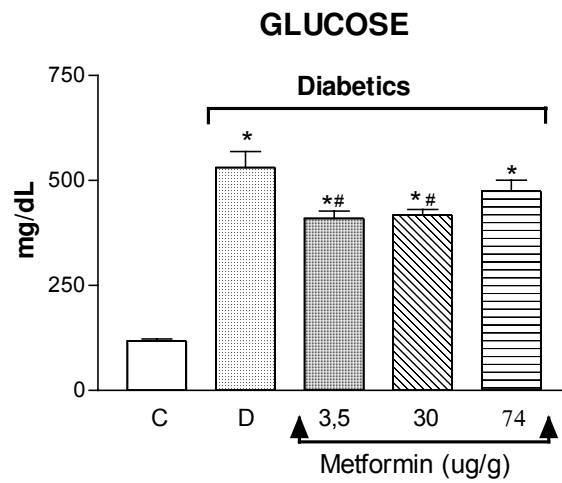


Figure 1: Changes in glycemia after alloxan induction and after 30 days of metformin treatment. * $p < 0.05$ vs control; # $p < 0.05$ vs diabetes.

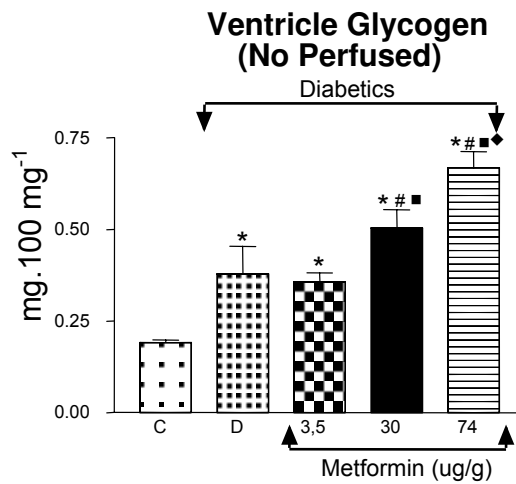
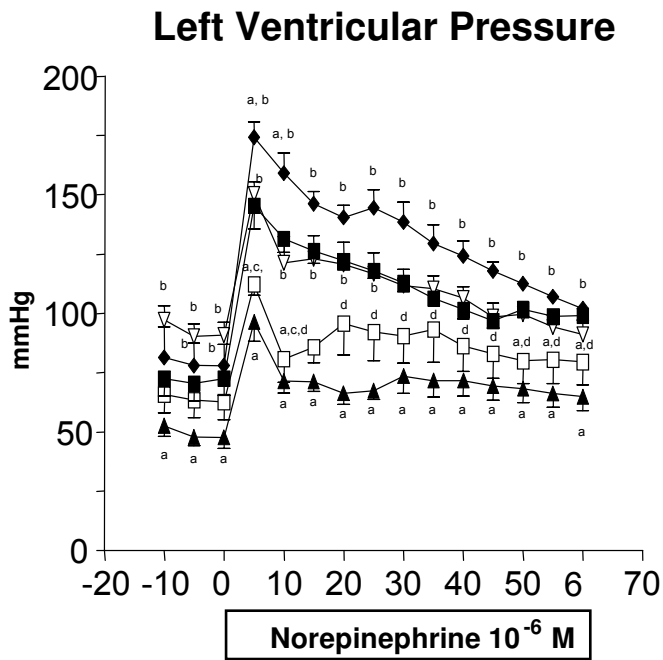
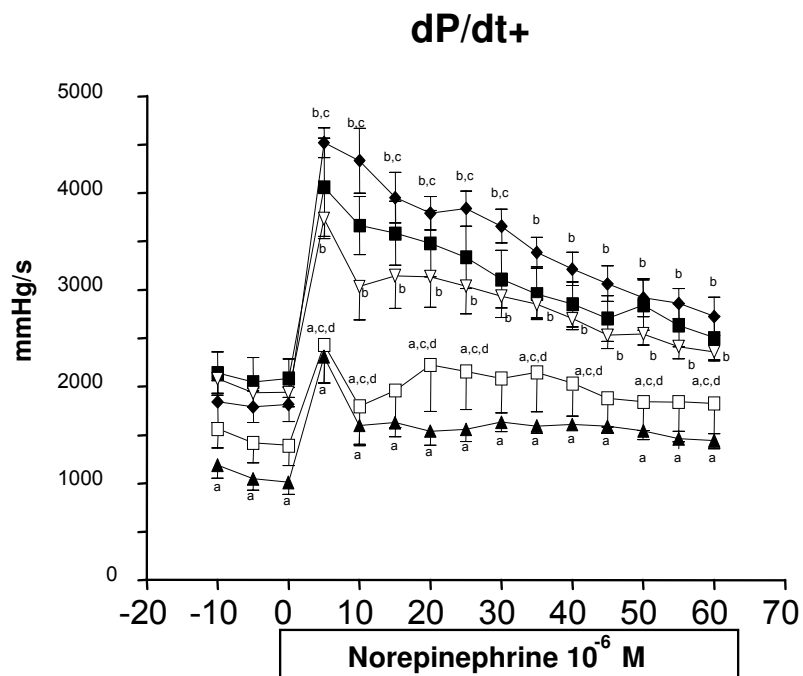


Figure 2: Changes in ventricle glycogen of non-perfused hearts after alloxan induction and after 30 days of metformin treatment. * $p < 0.05$ vs control; # $p < 0.05$ vs diabetes; ■ $p < 0.05$ vs diabetes metformin $3.5 \mu\text{g.g}^{-1}$ bw; ♦ $p < 0.05$ vs diabetes metformin $30 \mu\text{g.g}^{-1}$ bw.

A)



B)



C)

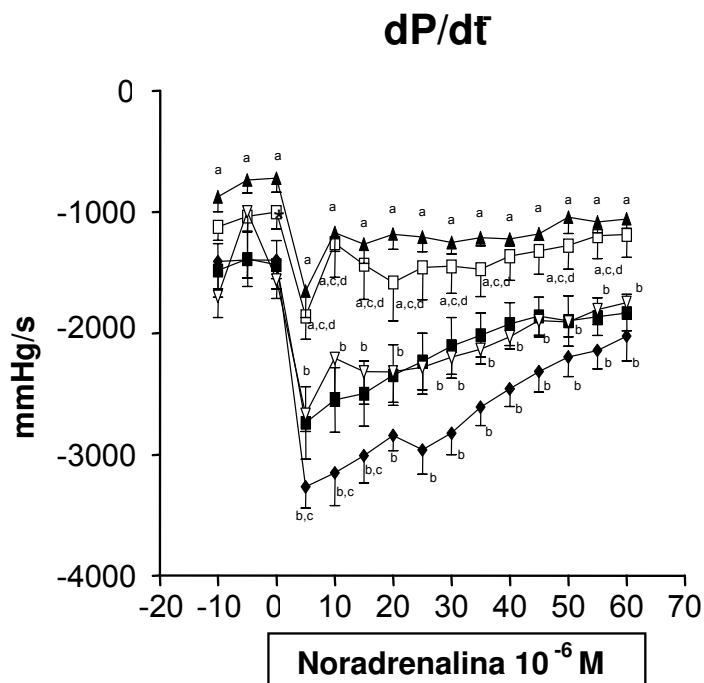
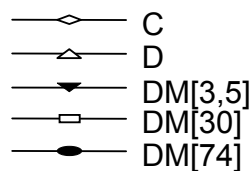


Figure 3 A, B, C: Changes in systolic ventricle pressure, dP/dt^+ and dP/dt^- in groups Control (C), Diabetes (D), Diabetes Metformin $3,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ bw (DM 3,5), Diabetes Metformin $30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ bw (DM 30) and Diabetes Metformin $74 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ bw (DM 74) after 60 minutes of norepinephrine perfusion. "a" $p < 0.05$ vs control; "b" $p < 0.05$ vs diabetes; "c" $p < 0.05$ vs diabetes metformin 3.5; "d" $p < 0.05$ vs diabetes metformin 30 .



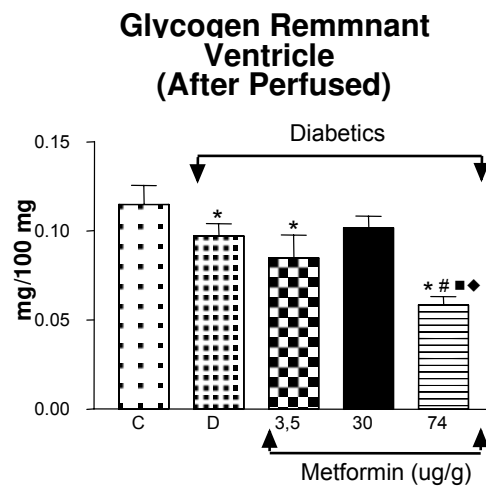


Figure 4: Changes in ventricle glycogen of hearts perfused by 60 minutes with norepinephrine after alloxan induction and after 30 days of metformin treatment. * $p < 0.05$ vs control; # $p < 0.05$ vs diabetes; ■ $p < 0.05$ vs diabetes metformin $3,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ bw; ♦ $p < 0.05$ vs diabetes metformin $30 \mu\text{g.g}^{-1}$ bw.