

ANTONIO DI PETTA

**Estudo das alterações morfofuncionais cardíacas
secundárias ao enfisema pulmonar induzido por elastase
pancreática de porco em ratos diabéticos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de: Cirurgia Torácica e
Cardiovascular

Orientadora: Profa. Dra. Paulina Sannomiya

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Di Petta, Antonio

Estudo das alterações morfofuncionais cardíacas secundárias ao enfisema pulmonar induzido por elastase pancreática de porco em ratos diabéticos / Antonio Di Petta. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
Orientadora: Paulina Sannomiya.

Descritores: 1.Enfisema pulmonar 2.Hipertrofia ventricular direita 3.Diabetes Mellitus 4.Cardiomiopatia diabética 5.Mortalidade 6.Elastase pancreática 7.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-431/14

Dedicatória

A minha noiva, minha eterna namorada, Camila
meu único e eterno amor.

Aos meus pais, Carmine e Antonietta
responsáveis pelo milagre da vida.

À minha irmã, Maria
pelo carinho, amizade e amor.

Ao meu filho, meu anjo, Gabriel
pelo carinho e amor em todos os momentos
onde a vitória parecia impossível.

A sempre e eterna Profa. Dra. Paulina
pelos ensinamentos, dedicação e paciência.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, discernimento e sabedoria.

Por estar sempre presente em minha vida,
principalmente nos momentos mais difíceis, em que os
obstáculos pareciam intransponíveis.

Obrigado Senhor.

À eterna, e única Profa. Dra. Paulina Sannomiya, pelo carinho e
dedicação despendidos por todos estes anos.

Obrigado por me ensinar a fazer ciência.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira, pela confiança,
ensinamento e compreensão durante a realização deste trabalho

A minha noiva, Camila, por me ensinar o verdadeiro significado
da palavra amor...

Aos meus pais, Carmine e Antonietta,
que sempre estiveram ao meu lado.

À meu filho Gabriel, pela paciência, carinho, dedicação e amor.

Aos colegas de laboratório Leila, Rafael, Laura e Fernando pela
amizade e apoio na realização deste trabalho.

Sumário

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Enfisema pulmonar.....	1
1.2. Hipertrofia ventricular direita secundária ao enfisema pulmonar.....	2
1.3. Diabetes mellitus e doenças cardiovasculares.....	3
2. OBJETIVOS.....	5
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
3.1. Animais.....	6
3.2. Indução do diabetes mellitus e tratamento com insulina.....	6
3.3. Indução do enfisema pulmonar.....	6
3.4. Protocolo experimental.....	7
3.5. Análise ecocardiográfica.....	8
3.6. Análise morfométrica do coração.....	9
3.7. Análise histológica dos cardiomiócitos.....	10
3.8. Análise histopatológica e morfométrica do parênquima pulmonar..	10
3.9. Análise estatística.....	11
4. RESULTADOS.....	12
5. DISCUSSÃO.....	22
6. CONCLUSÕES.....	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

Resumo

Di Petta A. Estudo das alterações morfofuncionais cardíacas secundárias ao enfisema pulmonar induzido por elastase pancreática de porco em ratos diabéticos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) está freqüentemente associada a comorbidades crônicas como a doença cardiovascular, o diabetes mellitus e a hipertensão. O presente estudo tem por objetivo investigar as alterações morfológicas e funcionais no coração secundárias ao enfisema pulmonar em ratos diabéticos.

Métodos: Ratos Wistar machos adultos (200 ± 20 g, $n = 36$) foram destinados à avaliação ecocardiográfica, análise morfométrica do coração e pulmões e análise da taxa de sobrevivência. O diabetes mellitus foi induzido por aloxana (42 mg/kg, iv) 10 dias antes da indução do enfisema pulmonar por instilação de elastase (0,25 UI/100 g de peso corpóreo). Um grupo de ratos diabéticos recebeu tratamento com insulina NPH (4 UI antes da elastase, seguido de 2 UI/dia, 50 dias). Os experimentos foram realizados 50 dias após a instilação.

Resultados: Ratos diabéticos e respectivos controles instilados com elastase apresentaram aumentos similares no diâmetro médio alveolar, cujos valores correlacionam-se positivamente com aumentos na espessura da parede ($p=0,0022$), na área da cavidade ($p=0,0001$) e espessura dos cardiomiócitos ($p=0,0001$) do ventrículo direito (VD). Ratos tornados diabéticos por injeção de aloxana exibiram redução na espessura da parede do ventrículo esquerdo (VE), no septo interventricular (IV) e na espessura dos cardiomiócitos. Estas variáveis morfométricas associaram-se à redução da fração de encurtamento do VE ($p<0,05$) e a aumento no tempo de relaxamento isovolumétrico do VE ($p<0,05$). A taxa de sobrevivência reduziu-se

de 80% em ratos diabéticos a 40% em ratos diabéticos instilados com elastase ($p < 0,05$).

Conclusões: O diabetes por aloxana em ratos não modifica a hipertrofia do VD secundária ao enfisema pulmonar, porém induz disfunção ventricular esquerda. A manifestação de ambas as doenças, diabetes mellitus e enfisema pulmonar, reduz substancialmente a taxa de sobrevivência, enfatizando a condição de comorbidade na coexistência de diabetes e DPOC.

Descritores: 1. Enfisema Pulmonar 2. Hipertrofia Ventricular Direita 3. Diabetes Mellitus 4. Cardiomiopatias Diabéticas 5. Mortalidade 6. Elastase Pancreática 7. Ratos Wistar

Summary

Di Petta A. Study of morphofunctional cardiac changes secondary to pulmonary emphysema induced by porcine pancreatic elastase in Diabetic Rats [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Background: Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is often associated with chronic comorbid conditions of cardiovascular disease, diabetes mellitus and hypertension. This study aimed to investigate morphological and functional alterations of the heart secondary to chronic emphysema in diabetic rats.

Methods: Adult male Wistar rats (200 ± 20 g, $n=36$) were used for echocardiographic measurements, morphometric analyses of the heart and lungs, and survival rate. Diabetes mellitus was induced by alloxan (42 mg/kg, iv) 10 days before the induction of pulmonary emphysema by the instillation of elastase (0.25 IU/100 g body weight). A group of diabetic rats was treated with NPH insulin (4 IU before elastase, plus 2 IU/day, 50 days). Experiments were performed 50 days after instillation.

Results: Both elastase-instilled diabetic rats and matching controls exhibited similar increases in mean alveolar diameter, which are positively correlated with increases in RV wall thickness ($p=0.0022$), cavity area ($p=0.0001$), and cardiomyocyte thickness ($p=0.0001$). Alloxan-diabetic rats demonstrated a reduction in left ventricular (LV) wall, IV septum, and cardiomyocyte thickness, associated with a reduction in LV fractional shortening ($p<0.05$), and an increase in LViv relaxation time ($p<0.05$). Survival rate decreased from 80% in diabetic rats to 40% in elastase-instilled diabetic rats.

Conclusions: Alloxan diabetes did not affect RV hypertrophy secondary to chronic emphysema, but induced LV dysfunction. The association of diabetes and emphysema substantially reduced the survival rate, emphasizing the comorbid condition of the coexistence of diabetes and COPD.

Descriptors: 1.Pulmonary Emphysema 2.Hypertrophy, Right Ventricular
3.Diabetes Mellitus 4. Diabetic Cardiomyopathies 5. Mortality 6. Pancreatic
Elastase 7. Rats, Wistar

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enfisema pulmonar

Segundo a definição da *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD, 2014), a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) caracteriza-se por limitação persistente ao fluxo aéreo, que usualmente progride com o tempo, e associa-se a uma resposta inflamatória crônica de vias aéreas, parênquima e vasculatura pulmonar a partículas ou gases tóxicos.

A limitação progressiva do fluxo aéreo na DPOC, particularmente no enfisema pulmonar, é causada pelo remodelamento e estreitamento das pequenas vias aéreas, associados à destruição do parênquima pulmonar e à conseqüente perda do recolhimento elástico, resultando em aprisionamento aéreo e hiperinsuflação pulmonar (Hogg et al., 2004; Barnes, 2014; GOLD, 2014).

Embora a causa mais comum da DPOC seja o tabagismo crônico, alguns pacientes desenvolvem a doença pela inalação da fumaça proveniente da queima de combustíveis ou partículas nocivas (Salvi et al., 2009). Apesar da DPOC relacionar-se à prática tabagista, apenas 25% dos fumantes desenvolvem a doença, sugerindo a existência de fatores genéticos, epigenéticos ou específicos do hospedeiro os quais predisõem o desenvolvimento da DPOC, embora estes ainda não tenham sido completamente identificados (Barnes, 2014).

Inúmeros processos parecem estar envolvidos com a patogenia do enfisema pulmonar. Porém, a hipótese do desequilíbrio enzimático proteinase-antiproteinase tem prevalecido como tema central. De acordo com esta hipótese, a destruição da parede alveolar resulta da ação de enzimas proteolíticas ativas que degradam a matriz extracelular (Hogg e Senior, 2002) e afetam a integridade de seus componentes, particularmente as fibras colágeno e elástica (GOLD, 2014). A inalação da fumaça proveniente do cigarro e outros agentes irritantes ativam as células epiteliais e macrófagos alveolares estimulando-os a liberarem uma série de fatores quimiotáticos que atraem as células inflamatórias para os pulmões. Estas células inflamatórias liberam proteases as quais promovem a degradação do componente elástico, além da proliferação dos fibroblastos, resultando em fibrose peribronquiolar das pequenas vias aéreas (Fahy e Dickey, 2010). Além do mais, neutrófilos, macrófagos e as células endoteliais contribuem para a degradação da matriz extracelular pela liberação de enzimas proteolíticas, principalmente a metaloproteinase 9 (Hogg e Senior, 2002; O'Reilly et al., 2009). Espécies reativas do oxigênio inativam as anti-proteases acelerando a degradação da fibra elástica no parênquima pulmonar e reduzem a expressão e a atividade da enzima sirtuina-1, favorecendo o processo de senescência celular (Nakamaru et al., 2009).

1.2. Hipertrofia ventricular direita secundária ao enfisema pulmonar

Pacientes com obstrução respiratória grave, mas com valores de gasometria relativamente normais, não demonstram hipertensão pulmonar.

No entanto, pacientes com hipoxemia apresentam hipertensão pulmonar acompanhada de evidências clínicas e ecocardiográficas de hipertrofia ventricular direita (Burrows et al., 1972; Incalzi et al., 1999). Estudos clínicos, envolvendo grande número de pacientes com DPOC e hipoxemia, evidenciaram aumento do volume do ventrículo direito (VD) associado à diminuição de sua função e prejuízo evidente na função ventricular esquerda (Boussuges et al., 2000; Scharf et al., 2002). Em estudo conduzido em pacientes enfisematosos com hipoxemia leve, Vonk-Noordegraaf e colaboradores (2005) evidenciaram que a hipertrofia ventricular direita é um dos primeiros sinais de sobrecarga pressórica no VD sem comprometer, nesta fase inicial, a função sistólica ventricular direita e esquerda. Além do mais, a redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (VE) pode ser compensada pelo deslocamento do septo interventricular em pacientes enfisematosos com hipertrofia do VD (Vonk-Noorfegraaf et al., 1997). Não apenas a fração de ejeção do VE, mas também a fração de ejeção do VD pode estar comprometida em decorrência da progressão da DPOC (Hur et al., 2007; Gao et al., 2012). Em suma, a hipertrofia do VD é um dos primeiros sinais da alteração cardíaca secundária ao enfisema pulmonar, podendo haver disfunção ventricular direita dependendo da gravidade da lesão enfisematosa.

1.3. Diabetes mellitus e doenças cardiovasculares

O diabetes mellitus pode levar à insuficiência cardíaca ao intensificar os fatores de risco cardiovasculares e, principalmente, por desencadear um

efeito direto sobre o miocárdio. Esta condição, conhecida como cardiomiopatia diabética, caracteriza-se por uma disfunção do miocárdio independente da coexistência de doença artério coronária, hipertensão ou doença valvular cardíaca (Huang et al, 2013; Ward e Crossman, 2014; Wu et al., 2014). Considerando a patogenia da cardiomiopatia diabética, numerosos estudos clínicos e experimentais relatam a existência de uma estreita relação entre o diabetes mellitus e insuficiência cardíaca (Rubler et al., 1972; Zarich et al., 1988; Riggs e Transue, 1990; Hoit et al., 1999; Mihm et al., 2001; Akula et al., 2003; Weytjens et al., 2008; van den Brom et al., 2009; van den Brom et al., 2010 Weytjens et al., 2010). Manifestações decorrentes de aterosclerose como angina pectoris, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva, são comuns em pacientes diabéticos quando comparadas com a população não diabética (Rytter et al., 1985; Ulvenstam et al., 1985).

Em vista do exposto, pretende-se investigar o desenvolvimento de alterações cardíacas decorrentes da coexistência de diabetes e enfisema pulmonar em modelo experimental.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar as alterações morfofuncionais cardíacas secundárias ao enfisema pulmonar induzido por elastase pancreática de porco em ratos diabéticos.

Objetivos específicos

- 1) Analisar os parâmetros ecocardiográficos;
- 2) Avaliar as alterações morfométricas do coração;
- 3) Avaliar as alterações histopatológicas e morfométricas do parênquima pulmonar;
- 4) Avaliar a taxa de sobrevivência dos animais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolado sob nº SDC 3501/10/090. Utilizaram-se ratos Wistar, machos, com 2 meses de idade e peso entre 200 e 220 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ em ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração.

3.2. Indução do diabetes mellitus e tratamento com insulina

Para a indução do diabetes mellitus os ratos receberam uma injeção intravenosa de aloxana (42 mg/Kg) dissolvida em solução salina fisiológica. Animais controle receberam volume equivalente de solução salina pela mesma via. A glicemia foi determinada em amostras de sangue obtidas da extremidade da cauda dos animais, utilizando-se um glicosímetro (Boehringer-Mannheim). Foram considerados diabéticos os ratos com glicemia superior a 11,2 mmol/L. Um grupo de animais diabéticos foi tratado com insulina NPH (Neutral Protamine Hagedorn) na dose de 4 UI, por via subcutânea, 2 horas antes da indução do enfisema, seguido de 2 UI/dia por 50 dias.

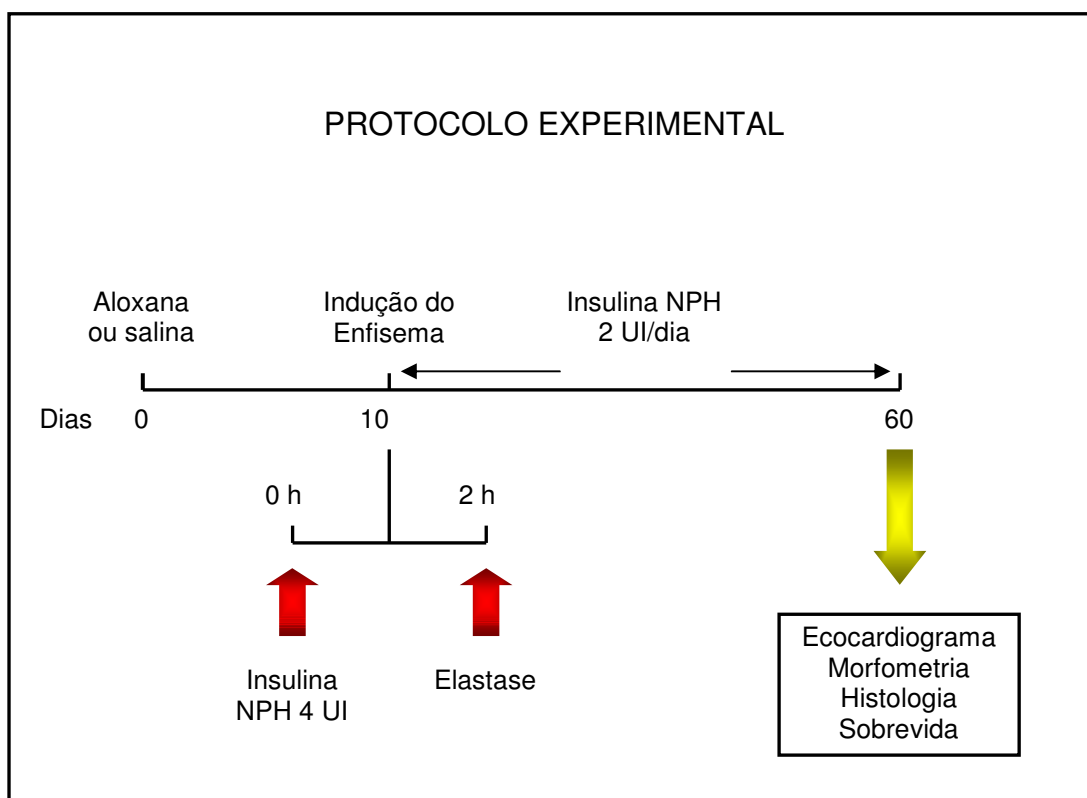
3.3. Indução do enfisema pulmonar

Sob anestesia com hidrato de cloral (400 mg/Kg intraperitoneal), os animais foram submetidos à entubação orotraqueal sob visão direta com

auxílio de um laringoscópio pediátrico com lâmina adaptada para pequenos animais, sendo introduzida uma sonda de polietileno de 2 mm de diâmetro e 7 cm de extensão. A ventilação mecânica foi estabelecida com um ventilador Harvard® (modelo 683, Harvard-Rodent Ventilator) com volume corrente de 10 ml/Kg e frequência respiratória de 80 ciclos por minuto. Em seguida, os animais foram instilados com dose única (0,25 UI/100 g de peso corpóreo) de elastase pancreática de porco (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) diluída em solução salina, em volume final de 500 µL. A instilação foi realizada de forma lenta e durante a inspiração.

3.4. Protocolo experimental

Os animais foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos experimentais: (1) Grupo Controle (C) ratos não-diabéticos submetidos à instilação intratraqueal de salina; (2) Grupo Diabético (D) ratos diabéticos submetidos à instilação intratraqueal de salina; (3) Grupo Controle-Elastase (CE) ratos não-diabéticos submetidos à instilação intratraqueal de elastase; (4) Grupo Diabético-Elastase (DE) ratos diabéticos submetidos à instilação intratraqueal de elastase; (5) Grupo Diabético-Elastase tratado com Insulina (DEI) ratos diabéticos submetidos à instilação intratraqueal de elastase e tratados com insulina NPH.



3.5. Análise ecocardiográfica

Sob anestesia com hidrato de cloral (400 mg/Kg intraperitoneal) os animais foram submetidos à tricotomia da região do tórax, posicionados em decúbito dorsal com as patas dianteiras distendidas, aplicando-se o gel de transmissão do ultra-som no precórdio. O ecocardiograma transtorácico foi realizado utilizando-se o ecocardiógrafo Acuson Sequóia 512, equipado com um transdutor 13-MHz linear. A imagem sonográfica do coração foi gravada no modo bidimensional na visão precordial do eixo longo do coração, seguido pela visão de eixo curto do ventrículo esquerdo (VE). Todas as medições foram feitas de acordo com a Sociedade Americana de Ecocardiografia (Sahn et al., 1978).

A análise incluiu os seguintes índices (Bilate et al., 2003):

- Fração de ejeção do VE (%)
- Fração de encurtamento do VE (%)
- Tempo de relaxamento isovolumétrico do VE (ms)
- Diâmetro interno do VE em sístole (mm)
- Diâmetro interno do VE em diástole (mm)
- Espessura da parede posterior do ventrículo direito em sístole (mm)
- Espessura do septo interventricular em diástole (mm)

3.6. Análise morfométrica do coração

Após a realização do ecocardiograma, os corações foram retirados e imersos em solução de paraformaldeído a 10%, por um período mínimo de 48 horas. Após fixação, realizou-se a secção transversal dos ventrículos no ponto médio da distância entre o ápice e o sulco coronário do coração. As peças foram fotografadas (câmera digital Sony, CyberShot) mantendo-se a distância constante. As imagens foram digitalizadas e as mensurações das estruturas cardíacas realizadas com o auxílio do software *Image Tool*, desenvolvido pelo *Department of Dental Diagnostic Science of the University of Texas Health Science Center, San Antonio, USA*. As seguintes estruturas foram mensuradas:

- Espessura da parede do ventrículo direito
- Espessura do septo interventricular
- Espessura da parede do ventrículo esquerdo
- Área da cavidade ventricular direita
- Área da cavidade ventricular esquerda

3.7. Análise histológica dos cardiomiócitos

Amostras do miocárdio, fixadas em paraformaldeído (10%) e incluídas em parafina, foram submetidas a cortes de 5 μm e coradas por hematoxilina-eosina. Procedeu-se a análise da espessura das fibras musculares, utilizando-se sistema de aquisição de imagens constituído por câmara digital (DS-Ri1 Camera, Nikon, Tokyo, Japan) acoplada a microscópio triocular (Eclipse E600, Nikon) e computador, sendo a análise realizada com auxílio de software (NIS-Elements Imaging Software, Nikon) em aumento final de 400X. Os resultados são expressos em μm .

3.8. Análise histopatológica e morfométrica do parênquima pulmonar

Após a realização do ecocardiograma, os pulmões foram retirados e imersos em solução de paraformaldeído a 10% sob pressão de 20 cm de H_2O por 12 horas. Após fixação, cortes coronais dos pulmões direito e esquerdo foram incluídos em blocos de paraplast. Cortes de 5 μm de espessura foram corados pela hematoxilina e eosina. A análise morfométrica do parênquima pulmonar foi realizada com o auxílio de um retículo, constituído de 100-pontos e 50-linhas, acoplado à ocular do microscópio óptico (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Germany) segundo técnica descrita por Weibel (1990). Analisaram-se 20 campos por amostra, em aumento final de 400x. Os pontos do retículo coincidentes com os espaços aéreos dos alvéolos, o lúmen do vaso sanguíneo e lúmen bronquiolar foram excluídos. Os resultados são apresentados como diâmetro médio alveolar (μm). Para a análise quantitativa de fibras elásticas nos septos alveolares, os cortes foram

corados pelo método da resorcina-fucsina de Weigert modificado por oxidação (Fullmer et al., 1974) e para a quantificação de fibras colágeno nos septos alveolares, os cortes foram corados pelo vermelho de Sirius dissolvido em solução aquosa saturada de ácido pícrico e observados em microscopia de luz polarizada (Montes, 1996). Analisaram-se 10 campos por amostra, em aumento final de 400x, utilizando-se o sistema de análise digital constituído por um microscópio óptico (Eclipse E600, Nikon), câmera digital (DS-Ri1 Camera, Nikon, Tokyo, Japan), computador e software (NIS-Elements Imaging Software, Nikon). Os resultados são apresentados como a fração de área (%) ocupada por fibras elásticas ou fibras colágeno.

3.9. Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (epm). Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações. A correlação entre a magnitude da lesão enfisematosa e variáveis morfométricas do ventrículo direito foi realizada utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson. A sobrevida foi avaliada pelo teste de Kaplan-Meier. Considerou-se significativo $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Comparado aos animais controles, ratos tornados diabéticos pela injeção de aloxana, 60 dias antes, exibiram hiperglicemia acentuada e significativa redução no ganho de peso corpóreo. O tratamento prolongado (50 dias) dos animais diabéticos com insulina reduziu a hiperglicemia sem, entretanto, normalizá-la. Houve aumento significativo no ganho de peso corpóreo, o que sugere melhora na condição metabólica dos animais sob tratamento com o hormônio. Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 1.

Procedendo-se a avaliação do enfisema pulmonar, ratos instilados com elastase apresentaram alterações morfológicas características de lesão enfisematosa, com hiperdistensão dos espaços alveolares e ruptura dos septos. Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar, ilustradas na Figura 1A, incluem amostra de pulmão de rato controle instilado com salina (CS), onde se observa a manutenção da arquitetura lobular e acinar, e amostras de pulmão de ratos controle e diabético instilados com elastase (CE, DE). Avaliando-se a extensão da lesão enfisematosa, verificaram-se aumentos equivalentes no diâmetro médio alveolar em ambos os grupos, comparados com seus respectivos grupos instilados com salina (CS, DS). A extensão da lesão enfisematosa não foi alterada pelo tratamento dos ratos diabéticos com insulina (DEI). Procedendo-se a quantificação de fibras elásticas e fibras colágeno, verificou-se expressiva redução na porcentagem de fibras elásticas acompanhada de aumento significativo na porcentagem de fibras colágeno

nos grupos CE e DE comparados a seus respectivos grupos instilados com salina, CS e DS. Esta situação não foi alterada pelo tratamento dos ratos diabéticos com insulina (DEI). Os resultados encontram-se ilustrados na Figura 1B.

A análise morfométrica do coração demonstrou aumento equivalente na espessura da parede (~40%) e área da cavidade (~40%) do VD nos grupos CE e DE comparados aos grupos CS e DS. Esta situação não foi alterada no grupo DEI, tratado com insulina (Fig. 2A, B). Aumentos em ambas variáveis, espessura da parede e área da cavidade, correlacionam-se positivamente com aumentos no diâmetro médio alveolar (Fig. 2A, B).

Resultados semelhantes foram obtidos pela análise histológica dos cardiomiócitos. Conforme ilustrado na Figura 3A, verificou-se um aumento (~15%) na espessura da fibra muscular do VD nos grupos CE e DE comparado aos grupos CS e DS. Esta situação não foi alterada no grupo DEI, tratado com insulina. Aumentos na espessura da fibra muscular correlacionam-se positivamente com aumentos no diâmetro médio alveolar (Fig. 3A). Fotomicrografias representativas encontram-se ilustradas na Figura 3B.

Os resultados obtidos pela análise morfométrica do VE encontram-se resumidos na Tabela 2. Verificou-se redução na espessura da parede do VE (45%) e do septo interventricular (40%) no grupo DS comparado aos demais grupos. Estas alterações foram acompanhadas por aumento significativo (73%) na área da cavidade ventricular no grupo DS comparado ao CS. Resultados semelhantes foram obtidos pela análise histológica dos

cardiomiócitos. Conforme resumido na Tabela 2, observou-se uma redução (10%) na espessura da fibra muscular no VE comparado aos demais grupos.

A análise das variáveis ecocardiográficas, apresentadas na Tabela 3, demonstra redução de 20% na fração de encurtamento do VE nos grupos diabéticos comparados a seus respectivos controles. O tratamento dos animais diabéticos com insulina não modificou esta variável. Com relação ao tempo de relaxamento isovolumétrico do VE observou-se um aumento de 25% no grupo DS comparado aos grupos CS e DE. As demais variáveis, massa do VE, diâmetro interno do VE em sístole e diástole, espessura do septo interventricular, espessura da parede posterior do VE em diástole e fração de ejeção do VE não diferiram entre os grupos (Tabela 3).

A análise de sobrevida dos animais demonstrou diferença significativa entre os ratos DE, os quais exibiram 40% de sobrevida, e ratos DS os quais apresentavam 80% de sobrevida (Figura 4).

Tabela 1. Características gerais dos animais

Grupos	n	Glicemia (mmol/L)	Ganho de peso corpóreo (g)
Controle	13	5.78±0.10	250±11
Diabético	16	30.05±0,86 ^{*,†}	61±15 ^{*,†}
Diabético+Insulina	7	22.59±3.22 [*]	173±12 ^δ

Os valores representam a média±epm. O n representa o número de animais utilizados em cada grupo. *p<0,001, ^δp<0,01 *versus* valores correspondentes no grupo controle; [†]p<0,001 *versus* valores no grupo diabetico+insulina.

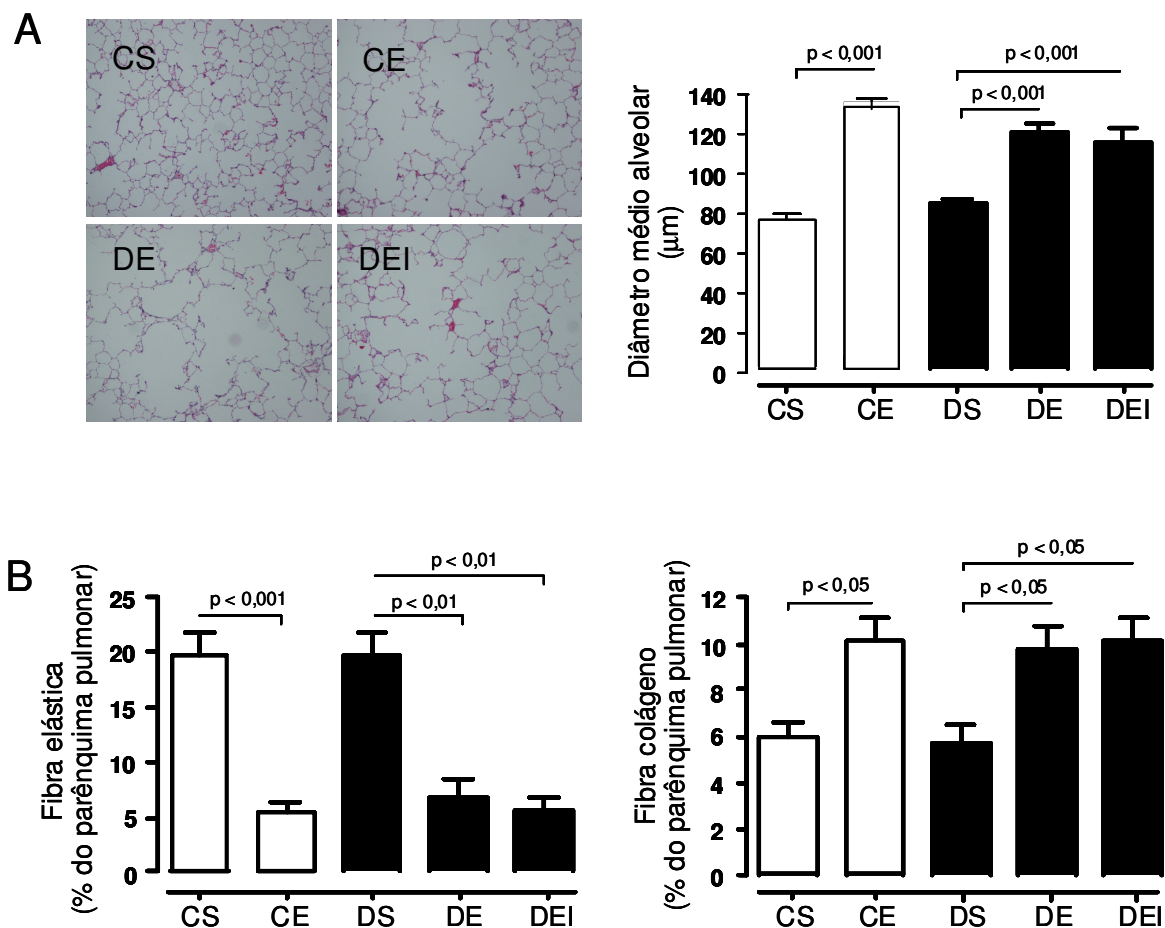


Figura 1. Análise morfométrica do pulmão. A, Fotomicrografias do parênquima pulmonar (hematoxilina-eosina, x400) e avaliação do diâmetro médio alveolar. As amostras foram obtidas de animais dos grupos controle-salina (CS, n=6), controle-elastase (CE, n=7), diabético-salina (DS, n=8), diabético-elastase (DE, n=7), e diabético-elastase tratado com insulina (DEI, n=7). Os valores representam a média \pm epm de 20 campos/rato. B, Avaliação do conteúdo de fibras elásticas e fibras colágeno. Os valores representam a média \pm epm de 10 campos/rato, 3 ratos/grupo.

VENTRÍCULO DIREITO

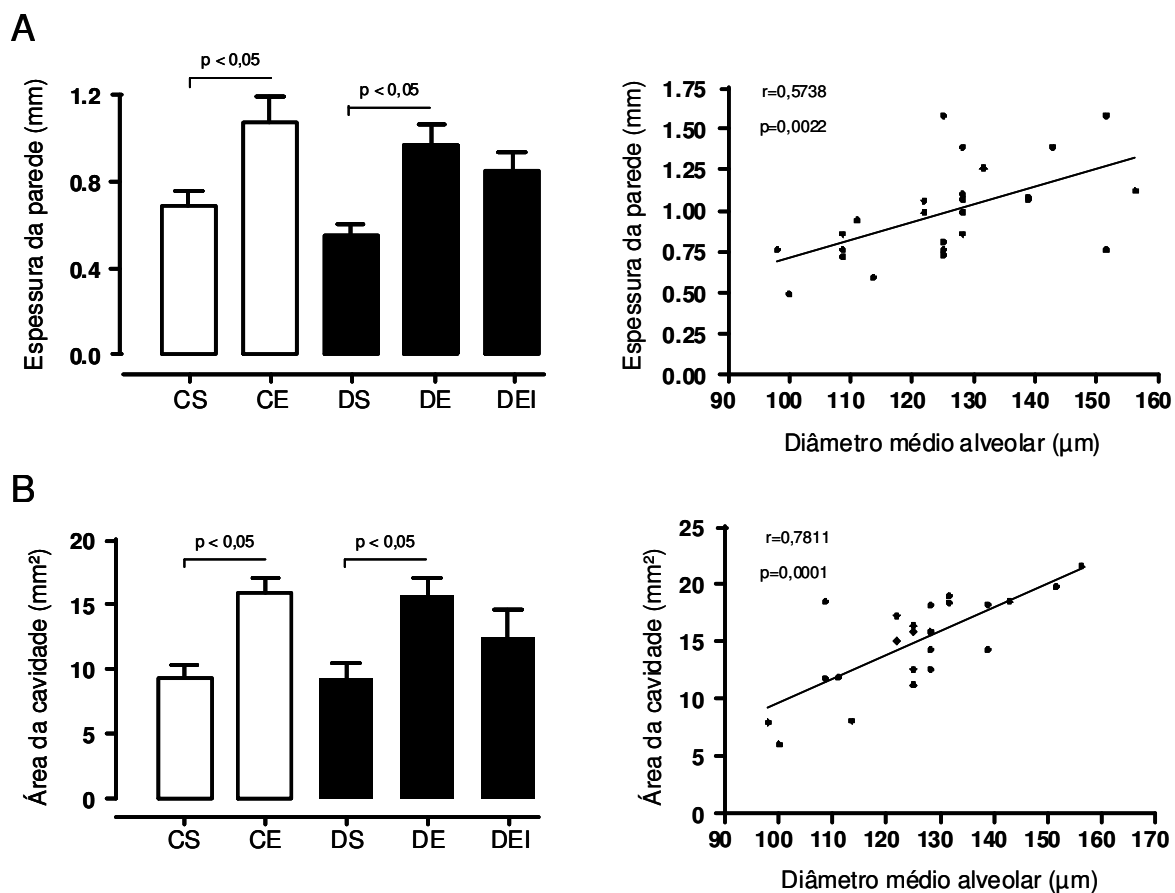


Figura 2. Análise morfométrica do coração. A, Espessura da parede ventricular direita e sua correlação com o diâmetro médio alveolar. B, Área da cavidade do ventrículo direito e sua correlação com o diâmetro médio alveolar. As amostras foram obtidas dos animais dos grupos controle-salina (CS, $n=6$), controle-elastase (CE, $n=7$), diabético-salina (DS, $n=8$), diabético-elastase (DE, $n=7$), e diabético-elastase tratado com insulina (DEI, $n=7$). Os valores representam a média \pm epm.

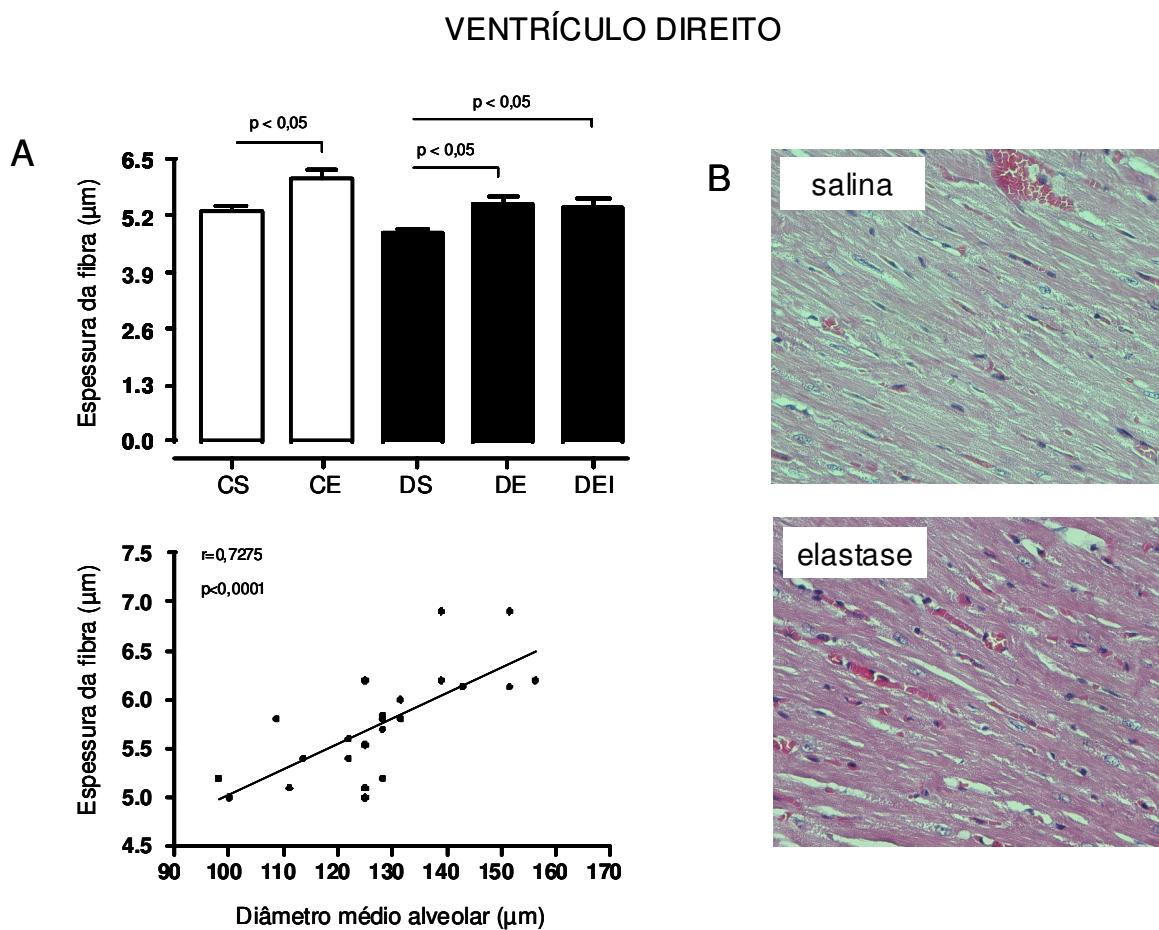


Figura 3. Análise histomorfométrica do ventrículo direito. A, Avaliação da espessura dos cardiomiócitos e sua correlação com o diâmetro médio alveolar. As amostras foram obtidas de animais dos grupos controle-salina (CS, n=6), controle-elastase (CE, n=7), diabético-salina (DS, n=8), diabético-elastase (DE, n=7), e diabético-elastase tratado com insulina (DEI, n=7). Os valores representam a média±epm de 10 campos/rato. B, Fotomicrografias do músculo cardíaco (hematoxilina-eosina, x400).

Tabela 2. Variáveis morfométricas do ventrículo esquerdo

Parâmetros	CS (6)	CE (7)	DS (8)	DE (8)	DEI (7)	p ANOVA
Espessura da parede do VE (mm)	3.31±0.19	3.60±0.07	1.82±0.12*	3.18±0.19	3.02±0.12	<0.0001
Area da cavidade do VE (mm ²)	1.99±0.26	2.00±0.35	7.25±1.10 ^{‡,§}	4.43±0.92	1.84±0.48	<0.0001
Espessura do septo IV (mm)	3.28±0.09	3.58±0.13	2.01±0.25 ^{‡,†}	3.22±0,20	3.61±0,28	<0.0001
Espessura da fibra do VE (µm)	6.07±0.15	6.46±0.17	5.46±0.05 [#]	6.22±0.16	6.18±0.14	<0.0012
Peso cardíaco (g)	1.27±0.04	1.36±0.06	0.76±0.038 ^{+,}	0.80±0.062 ^{+,π}	1.10±0.064 ^θ	<0.0001

CS, controle-salina; CE, controle-elastase; DS, diabético-salina; DE, diabético-elastase; DEI, diabético-elastase tratado com insulina. Os valores representam a média±epm. *p<0,0001 *versus* demais grupos; ‡p<0,0001 *versus* DEI; §p<0,001 *versus* CS, CE; †p<0,01 *versus* CS, CE; #p<0,05 *versus* demais grupos. +p<0,0001 *versus* CS, CE; ||p<0,001, πp<0,01 *versus* DEI; θp<0,05 *versus* CE.

Table 3–Variáveis ecocardiográficas

Parâmetros	CS (6)	CE (7)	DS (8)	DE (8)	DEI (7)	<i>p</i> ANOVA
Massa VE (g)	0.90±0.02	0.94±0.04	0.83±0.02	0.87±0.03	0.86±0.02	0.0589
Diâmetro VE sístole (mm)	3.25±0.31	2.86±0.19	3.18±0.19	3.90±0.30	3.47±0.32	0.1114
Diâmetro VE diástole (mm)	6.53±0.13	6.26±0.30	6.10±0.27	6.65±0.39	6.24±0.44	0.7692
Espessura septo IV diástole (mm)	1.06±0.08	1.00±0.05	1.07±0.09	1.17±0.13	0.88±0.05	0.2587
Espessura VE diástole (mm)	1.25±0.14	1.16±0.08	1.21±0.12	1.17±0.11	1.00±0.03	0.5308
Fração de encurtamento VE (%)	53.60±3.12	54.62±2.10	43.16±1.37 *	44.50±1.89 †	44.75±2.28 †	0.0009
Tempo de relaxamento VE (ms)	23.67±1.68	26.25±2.13	31.29±1.44 *	23.57±1.8	27.29±1.60	0.0304
Fração de ejeção VE (%)	85.50±3.53	89.00±1.60	81.71±2.49	81.42±1.19	80.57±2.69	0.0844

CS, controle-salina; CE, controle-elastase; DS, diabético-salina; DE, diabético-elastase; DEI, diabético-elastase tratado com insulina. Os valores representam a média±epm. **p*<0,05 versus respectivos controles; †*p*<0,05 versus CE.

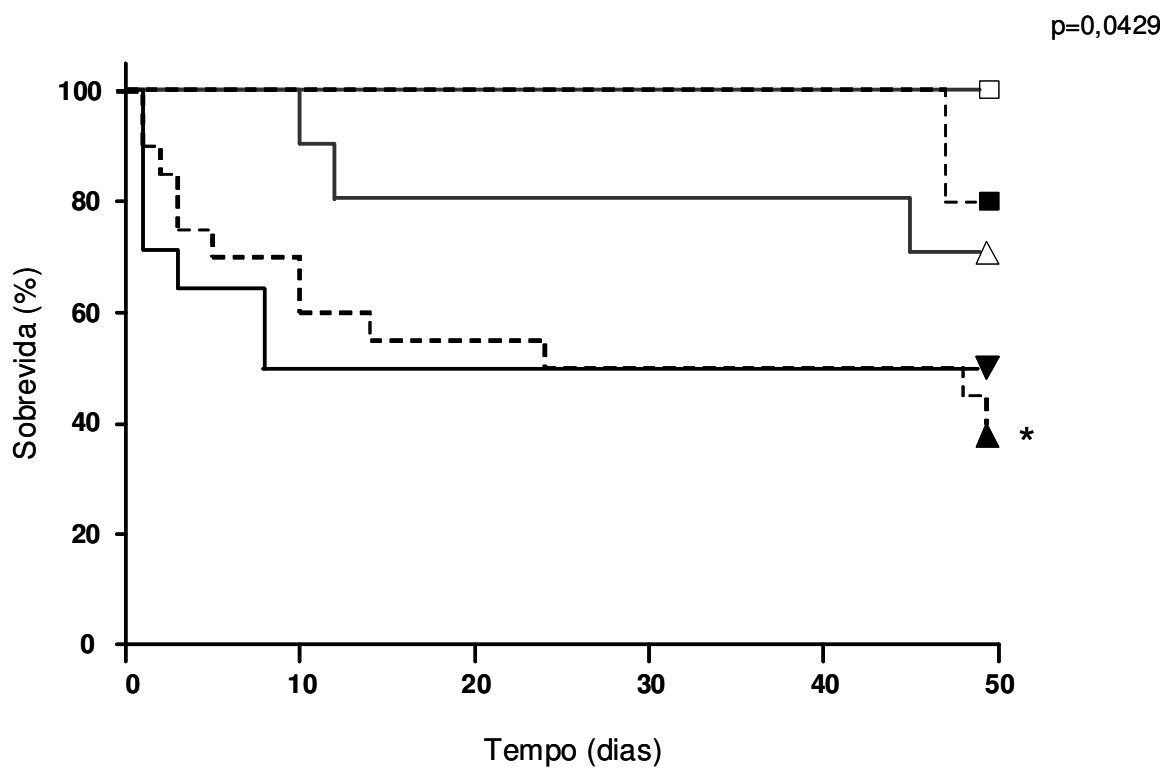


Figura 4. Análise da sobrevivência dos animais controle-salina (□); controle elastase (Δ); diabético-salina (■); diabético-elastase (▲); diabético-elastase tratados com insulina (▼). *p<0,05 *versus* respectivos valores no grupo diabético-salina.

5. DISCUSSÃO

Os dados apresentados indicam que o enfisema pulmonar, induzido por elastase pancreática de porco em ratos, foi capaz de determinar, no longo prazo, hipertrofia ventricular direita.

Verificou-se aumento da espessura da parede do VD associada a aumento da espessura dos cardiomiócitos e à dilatação da cavidade ventricular direita. Além do mais, estes achados apresentaram uma correlação positiva com a extensão da lesão enfisematosa, validando o modelo experimental de enfisema induzido por elastase em ratos. Os resultados obtidos assemelham-se aos observados em modelo experimental de enfisema em hamsters tratados com elastase (Avelar et al., 2005). Estes achados estão de acordo com estudo clínico que demonstrou a presença de hipertrofia ventricular direita como um dos primeiros sinais da adaptação ventricular à sobrecarga de pressão intermitente, presente em pacientes com DPOC (Vonk-Noordegraaf et al., 2005). Considerada a análise morfométrica do VE, torna-se necessário salientar que a indução do enfisema não alterou a espessura da parede do VE e do septo interventricular, a área da cavidade e a espessura dos cardiomiócitos no VE. Este achado está de acordo com estudos anteriores os quais demonstraram que a hipertrofia do VD secundária ao enfisema pulmonar não determina hipertrofia do VE (Vonk-Noordegraaf et al., 1997; Avelar et al., 2005).

Entretanto, conforme demonstrado, a lesão enfisematosa e a hipertrofia do VD exibida pelos ratos diabéticos foram de magnitude equivalente à

observada nos ratos controles não-diabéticos. Além do mais, o tratamento dos animais diabéticos com insulina não alterou esta situação. Em estudo anterior, demonstramos que a contínua deficiência de insulina, associada ao diabetes mellitus, influencia o desenvolvimento das respostas inflamatória e reparativa à instilação de elastase em ratos, comprometendo o remodelamento da parede alveolar que se segue ao enfisema (Di Petta et al., 2011). Todavia, devemos considerar o fato de que a lesão enfisematosa induzida no primeiro estudo (Di Petta et al., 2011) era de intensidade leve enquanto que, no presente estudo, os ratos apresentaram um enfisema de intensidade moderada à grave, de modo a favorecer o desenvolvimento de hipertrofia ventricular direita. Nesta condição, não foi observado o ajuste fino da insulina na resposta precoce à elastase limitando a intensidade da lesão, tal como demonstrado pelos valores obtidos no diâmetro médio alveolar, bem como na densidade de fibras colágeno e elástica, a qual foi equivalente nos ratos controles e diabéticos.

Alterações morfofuncionais do VE foram evidenciadas em ratos diabéticos, sugerindo a presença de cardiomiopatia associada ao diabetes mellitus.

Conforme demonstrado, ratos tornados diabéticos pela injeção de aloxana apresentaram uma redução na espessura da parede do VE e septo interventricular, redução na espessura dos cardiomiócitos, e aumento da área da cavidade ventricular esquerda. Estas alterações morfométricas associaram-se a aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico e

diminuição da fração de encurtamento do VE, conforme evidenciado por análise ecocardiográfica. A disfunção diastólica, caracterizada pelo comprometimento do relaxamento do músculo ventricular durante a diástole, é o sinal mais precoce da cardiomiopatia diabética (Romano et al, 2010; Pappachan et al, 2013). Hipertrofia e fibrose ventricular causadas pela cardiomiopatia diabética são os elementos responsáveis pela disfunção diastólica. A disfunção sistólica manifesta-se somente nos estágios avançados da doença (Liu et al, 2001; Romano et al, 2010; Voulgari et al, 2010; Pappachan et al, 2013). Pacientes diabéticos exibem disfunção ventricular esquerda independente de doença coronariana e hipertensão arterial (Rubler et al., 1972; Zarich et al., 1988; Riggs e Transue, 1990). Considerando a cardiomiopatia diabética, estudos clínicos e experimentais relatam a existência de uma estreita relação entre o diabetes mellitus e insuficiência cardíaca (Weytjens et al., 2008, 2010; van den Brom et al., 2009, 2010). A presença de cardiomiopatia diabética já havia sido demonstrada experimentalmente em modelo de diabetes induzido por estreptozotocina seja por análise histológica, ecocardiográfica ou por ressonância nuclear magnética (Hoit et al., 1999; Mihm et al., 2001; Akula et al., 2003; Weytjens et al., 2008; van den Brom et al., 2009; van den Brom et al., 2010; Weytjens et al., 2010). Considerando os resultados obtidos no presente estudo, podemos sugerir o modelo de diabetes por aloxana adequado à investigação experimental da cardiomiopatia diabética.

Finalmente, a coexistência de diabetes mellitus e enfisema pulmonar reduziu, substancialmente, a taxa de sobrevivência dos animais.

Ratos diabéticos e enfisematosos demonstraram redução significativa na taxa de sobrevivência quando comparados a animais diabéticos. Embora o tratamento dos animais com doses diárias de insulina tenha reduzido a hiperglicemia e favorecido o ganho de peso corpóreo, não alterou a taxa de sobrevivência de animais com ambas as doenças. Em pacientes com diabetes e DPOC o risco de óbito aumenta progressivamente em função da hiperglicemia (Baker et al., 2006) e o tempo de internação por exacerbação do quadro da DPOC aumenta 10% (Parappil et al., 2010). Estudos clínicos evidenciaram prognóstico desfavorável da DPOC quando associada a comorbidades como o diabetes mellitus. Pacientes com DPOC e diabetes exibem um quadro mais grave de DPOC e descompensação do diabetes (Makarevich et al., 2007). Além do mais, pacientes diabéticos e enfisematosos apresentam maior índice de mortalidade quando comparados a pacientes apenas enfisematosos (Seshasai et al., 2011).

Em suma, o diabetes por aloxana em ratos não modifica a hipertrofia do ventrículo direito secundária ao enfisema pulmonar, porém induz disfunção ventricular esquerda. A manifestação de ambas as doenças, diabetes mellitus e enfisema pulmonar, reduz substancialmente a taxa de sobrevivência, enfatizando a condição de comorbidade na coexistência de diabetes e DPOC.

6. CONCLUSÕES

(1) O enfisema pulmonar, induzido por elastase pancreática de porco em ratos, foi capaz de determinar, no longo prazo, hipertrofia ventricular direita.

(2) A coexistência de diabetes mellitus e enfisema pulmonar determinou, no longo prazo, hipertrofia ventricular direita de magnitude equivalente àquela observada nos ratos controles enfisematosos.

(3) As alterações morfométricas cardíacas, características da hipertrofia ventricular direita, correlacionam-se positivamente com a magnitude da lesão enfisematosa.

(4) As alterações morfofuncionais do ventrículo esquerdo sugerem a presença de cardiomiopatia associada ao diabetes mellitus.

(5) A coexistência de diabetes mellitus e enfisema pulmonar reduziu, substancialmente, a taxa de sobrevivência dos animais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akula A, Kota MK, Gopisetty SG, Chitrapu RV, Kalagara M, Kalagara S, Veeravalli KK, Gomedhikam. Biochemical, histological and echocardiographic changes during experimental cardiomyopathy in STZ-induced diabetic rats. *Pharmacol Res.* 2003; 48:429-35.

Avelar E, Jalili T, Dong L, Arvizo J, Hu P, Litwin SE, Mattson JP. PKC translocation and ERK1/2 activation in compensated right ventricular hypertrophy secondary to chronic emphysema. *BMC Physiol.* 2005;5(1):6.

Baker EH, Janaway CH, Philips BJ, Brennan AL, Baines DL, Wood DM, Jones PW. Hyperglycemia is associated with poor outcomes in patients admitted to hospital with acute exacerbations of COPD. *Thorax.* 2006;61:284-9.

Barnes PJ. Cellular and Molecular Mechanisms of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin Chest Med.* 2014;35(1):71-86.

Bilate AMB, Salemi VMC, Ramires FJA, de Brito T, Silva AM, Umezawa ES, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. The Syrian hamster as a model for the dilated cardiomyopathy of Chagas' disease: a quantitative echocardiographical and histopathological analysis. *Microbes Infect.* 2003;5:1116-24.

Boussuges A, Pinet C, Molenat F, Burnet H, Ambrosi P, Badier M, Sainty JM, Orehek J. Left atrial and ventricular filling in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:670-5.

Burrows B, Kettel LJ, Niden AH, et al. Patterns of cardiovascular dysfunction in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med.* 1972;286:912-18.

Di Petta A, Greco KV, Castro EO, Lopes FDTQS, Martins MA, Capelozzi VL, Moreira LFP, Sannomiya P. Insulin modulates inflammatory and repair responses to elastase-induced emphysema in diabetic rats. *Int J Exp Path.* 2011;92:392-9.

Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med.* 2010;363:2233-47.

Fullmer HM, Sheetz JH, Narkates AJ. Oxytalan connective tissue fibers: a review. *J Oral Pathol.* 1974;3,291-316.

Gao Y, Du X, Liang L, Cao L, Yang Q, Li K. Evaluation of right ventricular function by 64-row CT in patients with chronic obstructive pulmonary disease and cor pulmonale. *Eur J Radiol.* 2012;81:345-53

Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)*; 2014. <http://www.goldcopd.org/>.

Hogg JC, Senior RM. Chronic obstructive pulmonary disease c 2: pathology and biochemistry of emphysema. *Thorax*. 2002;57:830-4.

Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The nature of small airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;350:2645-53.

Hoit BD, Castro C, Bultron G, Knight S, Matlib MA. Noninvasive evaluation of cardiac dysfunction by echocardiography in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Card Fail*. 1999;5(4):324-333.

Huang ZG, Jin Q, Fan M, Cong XL, Han SF, Gao H, Shang Y. Myocardial remodeling in diabetic cardiomyopathy associated with cardiac mast cell activation. *PLoS ONE*. 2013;8:e60827.

Hur J, Kim TH, Kim SJ, Ryu YH, Kim JJ. Assessment of the right ventricular function and mass using cardiac multi-detector computed tomography in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Korean J Radiol*. 2007;8:15-21.

Incalzi RA, Fuso L, De Rosa M, Di Napoli A, Basso S, Pagliari G, Pistelli R. Electrocardiographic signs of chronic cor pulmonale: a negative prognostic finding in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation*. 1999;99:1600-5.

Liu JE, Palmieri V, Roman MJ, Bella JN, Fabsitz R, Howard BV, Welty TK, Lee ET, Devereux RB. The impact of diabetes on left ventricular filling pattern in normotensive and hypertensive adults: the Strong Heart Study. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:1943-9.

Makarevich AE, Valevich VE, Pochtavtsev AU. Evaluation of pulmonary hypertension in COPD patients with diabetes. *Adv Med Sci*. 2007;52:265-72.

Mihm MJ, Seifert JL, Coyle CM, Bauer JA. Diabetes related cardiomyopathy. Time dependent echocardiographic evaluation in an experimental rat model. *Life Sci*. 2001;69:527-42.

Montes GS. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic system. *Cell Biol Int*. 1996;20:15-27.

Nakamaru Y, Vuppusetty C, Wada H, Milne JC, Ito M, Rossios C, Elliot M, Hogg J, Kharitonov S, Goto H, Bemis JE, Elliott P, Barnes PJ, Ito K. A protein

deacetylase SIRT1 is a negative regulator of metalloproteinase-9. *FASEB J*. 2009;23:2810-9.

O'Reilly P, Jackson P, Noerager B, Parker S, Dransfield M, Gaggar A, Blalock JE. N-alpha-PGP and PGP, potential biomarkers and therapeutic targets for COPD. *Respir Res*. 2009;10:38-45.

Pappachan JM, Varughese GI, Sriraman R, Arunagirinathan G. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology, diagnostic evaluation and management. *World J Diabetes*. 2013;4:177-89.

Parappil A, Depczynski B, Collett P, Marks GB. Effect of comorbid diabetes on length of stay and risk of death in patients with acute exacerbations of COPD. *Respirology*. 2010;15:918-22.

Riggs TW, Transue D. Doppler echocardiographic evaluation of left ventricular diastolic function in adolescents with diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 1990;65:899-902.

Romano S, Di Mauro M, Fratini S, Guarracini L, Guarracini F, Poccia G, Penco M. Early diagnosis of left ventricular diastolic dysfunction in diabetic patients: a possible role for natriuretic peptides. *Cardiovasc Diabetol*. 2010;9:89

Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol*. 1972;30:595-602.

Rytter L, Troelsen S, Beck-Nielsen H. Prevalence and mortality of acute myocardial infarction in patients with diabetes. *Diabetes Care*. 1985;8:230-4.

Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet*. 2009;374:733-43.

Scharf SM, Iqbal M, Keller C, Criner G, Lee S, Fessler HE; National Emphysema Treatment (NETT) Group. Hemodynamic characterization of patients with severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:314-22.

Seshasai SR, Kaptoge S, Thompson A, Di Angelantonio E, Gao P, Sarwar N, Whincup PH, Mukamal KJ, Gillum RF, Holme I, Njølstad I, Fletcher A, Nilsson P, Lewington S, Collins R, Gudnason V, Thompson SG, Sattar N, Selvin E, Hu FB, Danesh J. Diabetes mellitus, fasting glucose and risk of cause specific death. *N Engl J Med*. 2011;364:829-41.

Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo A, Weyman, Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978;58:1072-83.

Ulvenstam G, Aberg A, Bergstrand R, Johansson S, Pennert K, Vedin A, Wilhelmsen L, Wilhelmsson C. Long-term prognosis after myocardial infarction in men with diabetes. *Diabetes*. 1985;34:787-92.

van den Brom CE, Huisman MC, Vlasblom R, Boontje NM, Duijst S, Lubberink M, Molthoff CFM, Lammertsma AA, Van der Velden J, Boer C, Ouwens DM, Diamant M. Altered myocardial substrate metabolism is associated with myocardial dysfunction in early diabetic cardiomyopathy in rats: studies using positron emission tomography. *Cardiov Diabetol* 2009; 8:39-50.

van den Brom CE, Bosmans JWAM, Vlasblom R, Handoko LM, Huisman MC, Lubberink M, Molthoff CFM, Lammertsma AA, Ouwens DM, Diamant M, Boer C. Diabetic cardiomyopathy in Zucker diabetic fatty rats: the forgotten right ventricle. *Cardiov Diabetol*. 2010;9:25-31.

Vonk Noordegraaf A, Marcus JT, Roseboom B, Postmus PE, Faes TJ, de Vries PM. The effect of right ventricular hypertrophy on left ventricular ejection fraction in pulmonary emphysema. *Chest*. 1997;112:640-645.

Vonk-Noordegraaf A, Marcus TJ, Holverda S, Roseboom B, Postmus PE. Early changes of cardiac structure and function in COPD patients with mild hypoxemia. *Chest*. 2005;127:1898-903.

Voulgari C, Papadogiannis D, Tentolouris N. Diabetic cardiomyopathy: from the pathophysiology of the cardiac myocytes to current diagnosis and management strategies. *Vasc Health Risk Manag* 2010;6:883-903.

Ward ML, Crossman DJ. Mechanisms underlying the impaired contractility of diabetic cardiomyopathy. *World J Cardiol*. 2014;6(7):577-84.

Weibel ER. *Morphometry: stereological theory and practical methods*. In: *Models of Lung Disease-Microscopy and Structural Methods*. New York: Marcel Dekker; 1990. p.199-247.

Weytjens C, Franken PR, D'hooge J, Droogmans S, Cosyns B, Lahoutte T, Van Camp G. Doppler myocardial imaging in the diagnosis of early systolic left ventricular dysfunction in diabetic rats. *Eur J Echocardiogr*. 2008;9:326-33.

Weytjens C, Cosyns B, D'hooge J, Droogmans S, Lahoutte T, Garbar C, Roossens B, Van Camp G. Evaluation of contractile function and inotropic reserve with tissue velocity, strain and strain rate imaging in streptozotocin-induced diabetes. *Eur J Echocardiogr*. 2010;11:622-9.

Wu Z, Chen Q, Ke D, Li G, Deng W. Emodin Protects against Diabetic Cardiomyopathy by Regulating the AKT/GSK-3 β Signaling Pathway in the Rat Model. *Molecules*. 2014;19(9):14782-93.

Zarich SW, Arbuckle BE, Cochen LR, Pobert M, Nesto RW. Diastolic abnormalities in young asymptomatic diabetic patients assessed by pulsed Doppler echocardiography. *J Am Coll Cardiol.* 1988;12:114-20.