

FLAVIO ARAUJO BORGES JUNIOR

A empagliflozina inibe a atividade do NHE3 no túbulo proximal, preserva a taxa de filtração glomerular e restaura a euvolemia em ratos não diabéticos com insuficiência cardíaca

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Profa. Dra. Adriana

Castello Costa Girardi

São Paulo

2023

FLAVIO ARAUJO BORGES JUNIOR

**A empagliflozina inibe a atividade do NHE3 no túbulo proximal, preserva a taxa de
filtração glomerular e restaura a euvolemia em ratos não diabéticos com
insuficiência cardíaca**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Profa. Dra. Adriana

Castello Costa Girardi

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Borges Junior, Flavio Araujo

A empagliflozina inibe a atividade do NHE3 no túbulo proximal, preserva a taxa de filtração glomerular e restaura a euvolemia em ratos não diabéticos com insuficiência cardíaca / Flavio Araujo Borges Junior. -- São Paulo, 2023.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientadora: Adriana Castello Costa Girardi.

Descritores: 1.Inibidores do transportador 2 de sódio-glicose 2.Insuficiência cardíaca 2.Trocador 3 de sódio-hidrogênio 3.Testes de função renal 4.Síndrome cardiorrenal

USP/FM/DBD-027/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À minha esposa **Lígia Sayuri**, à minha filha **Maria Eduarda**, aos meus pais **Flávio e Lúcia**, meus irmãos **Camila e Murilo** e meus avós maternos **Divina e Joaquim**,
Pessoas a quem estimo a maior gratidão pelo apoio incondicional, amor e incentivo
nesta e em todas as demais grandes etapas da vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À **Adriana Girardi** pelo exemplo constante e diário, variável e conduta de maior impacto na formação de uma pessoa. Seja no afincado e no propósito ou mesmo à frente de tantos aprendizados e circunstâncias ímpares compartilhadas em mais de cinco anos de convívio. Uma mulher que se soma à minha esposa, minha mãe, minha avó materna e minha irmã, no panteão de referências pessoais, ao me forjar doutor com uma jornada de perspectivas, adversidades e conquistas que fazem de uma etapa profissional, um amadurecimento pessoal de valor ainda maior. A ciência nacional e internacional muito se orgulha dos teus resultados, que Deus siga-lhe abençoando com saúde e força para seguir sendo exemplo e referência do que realmente deve ser feito. Com você aprendi e apliquei valores de humildade no trabalho e persistência na erudição para esmerar aquilo que de fato devemos cumprir como devolutiva científica para nossa sociedade. Eternamente, muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, grande arquiteto do universo, por me oportunizar vivenciar momentos tão caros e construtivos, chegando até aqui e encontrar pessoas de valor, aprendizado e convívio inestimáveis. Considero-me privilegiado ao extremo, por usufruir desde a formação no ensino fundamental e médio, ofertada por meus pais, de ferramentas de elevada qualidade de entrega para me formar médico, médico internista e hoje candidatar a conquista de doutor por esta nobre instituição.

À minha esposa **Lígia**, amor da minha vida, companheira leal e peça fundamental para chegar até aqui. Obrigado pelo convívio e cuidado diário, por tornar nossa casa um lar, pelo aconchego, apoio e estímulo aos estudos e pela paciência nos dias mais desafiadores. À minha filha **Maria Eduarda**, por ter ressignificado a nossa vida, e por ter deixado o restante do mundo tão pequeno perto da sua importância para nós.

Aos meus pais, **Flávio e Lúcia**, fontes inesgotáveis de carinho e educação, cuja história de vida fortifica valores e guia minha jornada diariamente. Aprendi com meu pai o apreço pelo trabalho, a humildade e a coragem para as mudanças. De minha mãe, trago a disciplina de cuidar e a coragem para executar o que tiver de ser feito. A **Murilo e Camila**, meus irmãos e portos seguros, com os quais sempre contei e contarei nos desafios desta vida. E também aos meus sogros, **João e Marisa**, pelo apoio irrestrito e amparo familiar na conclusão desta etapa.

Aos amigos do grupo Cardiorrenal/ Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM) do Incor/HCFMUSP, **Renato de Oliveira Crajoínas, Danúbia Silva dos Santos, Flávia Letícia Martins, Acaris Benetti, Daniel Ferreira Arruda Junior, Juliano Zequini Polidoro, Aline Cavalcanti Toledo e Thiago Matheus Santos Rios**. Obrigado pela parceria, paciência, respeito e dedicação. Vocês foram essenciais nesta jornada, das sessões intermináveis de experimentos, madrugada a fora, a momentos de convívio social e diversão que consolidam nossa valorosa amizade e vínculos que espero manter para o resto da vida.

Agradeço também aos amigos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da EPM/UNIFESP do Prof. Paulo Tucci, **Ednei Luiz Antônio e Prof. Andrei Serra**. Assim como

aos amigos ecocardiografistas no InCor/HCFMUSP, **Leonardo Jensen e Jaime Pessoa**, pela colaboração e parceria para conclusão desta etapa.

À banca examinadora titular e suplente pelo aceite do convite e contribuição neste processo de aprendizado.

Aos pesquisadores e funcionários do LGCM do InCor/HCFMUSP, local onde desenvolvi e aprimorei meus conhecimentos durante todo esse período.

À CAPES e à FAPESP, obrigado pela apreciação do projeto de pesquisa e pelo apoio financeiro dispensado a este trabalho.

“Não é nossa função controlar todas as marés do mundo, mas sim fazer o que pudermos para socorrer os tempos em que estamos inseridos, erradicando o mal dos campos que conhecemos, para que aqueles que viverem depois tenham terra limpa para cultivar. Que tempo encontrarão não é nossa função determinar.”

— J.R.R. Tolkien

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO

- 1.1. Contexto epidemiológico e clínico1
- 1.2. Disfunção cardíaca e hiperativação neuro-humoral2
- 1.3. Remodelamento ventricular e progressão para insuficiência cardíaca4
- 1.4. Dano glomerular e tubular renal na insuficiência cardíaca6
- 1.5. Expansão do volume extracelular e a participação do túbulo proximal renal8
- 1.6. Participação do balanço glicêmico na homeostase volêmica e a aplicação terapêutica da inibição dos cotransportadores de SGLT2 no modelo de insuficiência cardíaca10
- 1.7. Prováveis mecanismos pelos quais os inibidores de SGLT2 podem gerar efeitos de nefro e cardioproteção na insuficiência cardíaca – Justificativa para desenho do estudo experimental14

2. OBJETIVOS16

3. MATERIAIS E MÉTODOS

- 3.1. Modelo experimental de Insuficiência Cardíaca17
 - 3.1.1 Análise de função cardíaca por ecocardiograma transtorácico18
 - 3.1.2 Determinação dos níveis circulantes de BNP.....20
- 3.2. Aferição indireta da pressão arterial.....21
- 3.3. Mensuração da glicemia de jejum21
- 3.4. Avaliação da função renal22
- 3.5. Teste de sobrecarga salina23
- 3.6. Análise de parâmetros biométricos e morfométricos24
- 3.7. Análise de hipertrofia miocitária.....25

3.8. Avaliação de fibrose intersticial cardíaca	25
3.9. Análise imunohistoquímica de α -actina de músculo liso no tecido cardíaco	26
3.10. Preparação do homogenato de proteínas de córtex renal	26
3.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS para proteína e Immunoblotting .	27
3.12. Imunohistoquímica renal.....	28
3.13. Detecção de células em apoptose por TUNEL.....	28
3.14. RT-PCR Quantitativo em Tempo Real.....	29
3.15. Microperfusão estacionária do túbulo proximal.....	30
3.16. Análise estatística	34
4. RESULTADOS	
4.1. A empagliflozina reduz os níveis séricos de BNP, a hipertrofia do ventrículo direito (VD) e a relação peso pulmonar/comprimento da tibia em ratos HF não diabéticos	35
4.2. A empagliflozina atenua a hipertrofia miocitária, reduz o teor de colágeno intersticial e a expressão de α -SMA no tecido cardíaco remanescente	37
4.3. A empagliflozina induz maiores valores de glicosúria, diurese e natriurese em ratos HF do que em ratos Sham	41
4.4. O co-transportador SGLT2 encontra-se hiperexpresso no túbulo proximal de ratos HF não diabéticos.....	43
4.5. A empagliflozina restaura a euvolemia em ratos HF não diabéticos.....	45
4.6. A empagliflozina previne a redução da TFG, atenua a proteinúria e preserva a massa renal em ratos HF não diabéticos.....	47
4.7. A empagliflozina inibe a atividade de NHE3 no túbulo proximal.....	51
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
8. ANEXOS	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA – artéria descendente anterior

AJG - aparelho justaglomerular

Ang II – angiotensina II

ANP - peptídeo natriurético atrial

BNP – peptídeo natriurético cerebral

CV - cardiovascular

CVOT – estudos com desfechos cardiovasculares

Dapa - dapagliflozina

DM2 – Diabetes melito tipo 2

ADFVE - área diastólica final do ventrículo esquerdo

ASFVE - área sistólica final do ventrículo esquerdo

Empa – empagliflozina

EPM – Erro padrão da média

FAC - variação fracional de área

FEVE – fração de ejeção ventricular esquerda

FF – fração de filtração

HF - *heart failure*

HAS – hipertensão arterial sistêmica

IC – insuficiência cardíaca

ICFER – Insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida

ICFEP - Insuficiência cardíaca de fração de ejeção preservada

IAM – infarto agudo do miocárdio

iSGLT2 – Inibidores de SGLT2

$J_{\text{HCO}_3^-}$ - fluxo de bicarbonato

NHE- trocador sódio/hidrogênio

NHE1 – isoforma 1 do trocador de sódio/hidrogênio

NHE3 - isoforma 3 do trocador de sódio/hidrogênio

PS552-NHE3 – NHE3 fosforilado na serina 552

RNA_m - ácido ribonucleico mensageiro

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacríamida

SMA – actina de músculo liso

SRA – Sistema renina angiotensina

VD – ventrículo direito

VE – ventrículo esquerdo

SGLT1 - cotransportador de sódio-glicose do tipo 1

SGLT2 - cotransportador de sódio-glicose do tipo 2

TFG – taxa de filtração glomerular

TP – túbulo proximal

TUNEL – Marcação *Terminal Transferase-Mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling*

VEGF – fator de crescimento endotelial

LISTA DE FIGURAS

1. Fisiopatologia da retenção de sódio e água na IC	4
2. Interações cardiorrenais presentes na progressão da insuficiência cardíaca.....	7
3. Expansão do volume extracelular e a participação do túbulo proximal renal.....	8
4. Aumento da atividade e da expressão de NHE3 com menor fosforilação naS552-NHE3 na insuficiência cardíaca.....	10
5. Manuseio de glicose no túbulo proximal	11
6. Efeitos do DM2 e da inibição de SGLT2 nas arteríolas aferentes e eferentes, no RFG e na excreção de sódio	13
7. Desenho esquemático do estudo experimental	19
8. Diagrama CONSORT dos grupos HF e Sham com tratamento randomizado	20
9. Microperfusão de fluxo interrompido de segmentos de túbulos proximais renais in vivo.....	32
10. Representação de curvas obtidas durante os experimentos de microperfusão estacionária in vivo em túbulo proximal renal	33
11. O tratamento com empagliflozina normaliza a concentração sérica de peptídeo natriurético cerebral (BNP) e melhora discretamente a função sistólica do VE em ratos não diabéticos com insuficiência cardíaca	36
12. Avaliação da fibrose intersticial do miocárdio remanescente ao infarto	38
13. Análise imunohistoquímica de alfa-SMA no tecido cardíaco remanescente.....	39
14. Avaliação volume nuclear dos cardiomiócitos	40
15. O tratamento com empagliflozina induz maior glicosúria, fluxo urinário e excreção de sódio em ratos com insuficiência cardíaca (IC) do que em ratos Sham junto a avaliação da ingestão alimentar e hídrica.....	42 e 43
16. O cotransportador de sódio-glicose do tipo 2 (SGLT2) está hiperexpresso no túbulo proximal de ratos não diabéticos com IC.....	44 e 45
17. O tratamento com empagliflozina melhora o estado volêmico em ratos não diabéticos com insuficiência cardíaca	46 e 47
18. O tratamento com empagliflozina previne a redução da taxa de filtração glomerular e atenua a proteinúria em ratos com insuficiência cardíaca.....	49
19. O tratamento com empagliflozina normaliza a apoptose renal e cliva a abundância de caspase-3 em ratos com insuficiência cardíaca.....	50

20. O tratamento com empagliflozina inibe a atividade do NHE3 no TP.....	52 e 53
21. O tratamento com empagliflozina aumenta a fosforilação de NHE3 na serina 552	54 e 55
22. Desenho esquemático ilustrando mecanismo funcional hipotético de interação entre SGLT2 e NHE3 no TP renal e possível rearranjo provocado pelas gliflozinas	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de primers utilizados	30
Tabela 2. Parâmetros biométricos de ratos Sham e HF tratados ou não com o inibidor SGLT2 empagliflozina (EMPA) ou não tratada	37

RESUMO

Borges Júnior FA. A empagliflozina inibe a atividade do NHE3 no túbulo proximal, preserva a taxa de filtração glomerular e restaura a euvolemia em ratos não diabéticos com insuficiência cardíaca [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022

Os inibidores de SGLT2 melhoram o controle glicêmico suprimindo a recaptação de glicose no túbulo proximal renal (TP). Inicialmente desenvolvidos como agentes antidiabéticos, as gliflozinas reduzem morte por causa cardiovascular e a taxa de hospitalização por IC, independente da presença ou ausência de DM2. No entanto, os mecanismos subjacentes a estes robustos desfechos permanecem desconhecidos. Dado que o cotransportador de SGLT2 é expresso predominantemente no TP renal e considerando a fisiopatologia cardiorrenal na IC, este estudo tem como objetivo testar a hipótese de que o inibidor específico de SGLT2 empagliflozina exerce efeitos cardio e nefroprotetores em modelo experimental de IC não associado ao DM2. Testamos também a hipótese de que a empagliflozina inibe a atividade da isoforma 3 do trocador Na^+/H^+ (NHE3) no TP e melhora o manuseio renal de sal e água em ratos portadores de IC com fração de ejeção reduzida. Para tal, ratos Wistar machos foram submetidos ao infarto agudo do miocárdio para indução de IC ou cirurgia fictícia. Após quatro semanas, os animais que desenvolveram IC e os ratos Sham foram tratados com empagliflozina (Empa) ou não tratados por mais quatro semanas. Ratos HF tratados com Empa apresentaram menores concentrações séricas de peptídeo natriurético cerebral (BNP), menor hipertrofia do ventrículo direito e redução da fibrose intersticial e da hipertrofia miocitária. Na avaliação do manuseio renal de água e sal com sobrecarga salina, as respostas diuréticas e natriuréticas dos ratos HF tratados com Empa foram semelhantes às daquelas de ratos Sham e maiores do que as observadas em ratos HF não tratados. Ademais, o tratamento com Empa também normalizou a taxa de filtração glomerular e a proteinúria nos ratos portadores de IC. A atividade de NHE3 no TP renal foi maior em ratos HF do que em animais Sham, enquanto o tratamento com EMPA reduziu substancialmente a atividade deste trocador. Curiosamente, evidenciamos também o aumento da função e da expressão de SGLT2 no TP de ratos HF, além da redução desta hiperexpressão com a terapia gliflozina. Em conjunto, nossos dados mostram que a

prevenção da progressão da IC pela empagliflozina está associada à restauração da euvolemia com preservação da função glomerular e à inibição da atividade do NHE3 no túbulo proximal renal. Além disso, documentamos que a desregulação do TP com a hiperexpressão de SGLT2 pode estar envolvida na fisiopatologia da IC não diabética.

Descritores: Inibidores do transportador 2 de sódio-glicose. Trocador 3 de sódio-hidrogênio. Insuficiência cardíaca. Testes de função renal. Síndrome cardiorrenal

ABSTRACT

Borges Júnior, FA. Empagliflozin inhibits proximal tubule NHE3 activity, preserves glomerular filtration rate, and restores euvolemia in nondiabetic rats with induced heart failure [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022

SGLT2 inhibitors improve glycemic control by suppressing glucose reuptake in the renal proximal tubule (PT). Primarily designed as antidiabetic agents, the SGLT2 inhibitors also reduce cardiovascular (CV) death and hospitalization for HF, regardless of the presence or absence of T2D. However, the underlying mechanisms of these impressive outcomes remain unknown. Given that SGLT2 is predominantly expressed in the renal PT and the pathophysiology of the cardiorenal axis in HF, this study aims to test the hypothesis that the specific SGLT2 inhibitor empagliflozin exerts cardiac and renoprotective effects in an experimental model of HF not related to T2D. We also tested the hypothesis that empagliflozin inhibits the activity of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 (NHE3) in PT and improves renal handling of salt and water in rats with systolic HF. To this end, male Wistar rats were subjected to acute myocardial infarction for HF induction or sham surgery. After four weeks, rats that developed HF and Sham rats were treated with empagliflozin (EMPA) or untreated for an additional four weeks. EMPA-treated HF rats displayed lower serum brain natriuretic peptide (BNP) levels, reduced right ventricular hypertrophy, and decreased interstitial fibrosis and cardiomyocyte hypertrophy. Upon saline challenge, the diuretic and natriuretic responses of EMPA-treated HF rats were similar to those of Sham rats and higher than those of untreated HF rats. Additionally, EMPA treatment normalized the glomerular filtration rate and proteinuria in HF rats. PT NHE3 activity was higher in HF rats than in Sham rats, whereas treatment with EMPA markedly reduced NHE3 activity. Unexpectedly, we have also evidenced an increase in the function and expression of SGLT2 in the PT of HF rats and decreased this dysfunction with empagliflozin. Collectively, our data show that prevention of HF progression by empagliflozin is associated with the restoration of euvolemia, at least through the preservation of glomerular function and inhibition of PT NHE3 activity in the renal proximal tubule. Moreover, we provided novel evidence that the dysregulation of PT SGLT2 may be involved in the pathophysiology of nondiabetic HF.

Descriptors: Sodium-glucose transporter 2 Inhibitors. Sodium-hydrogen exchanger 3.
Heart failure. Kidney function tests. Cardio-renal syndrome

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contexto epidemiológico e clínico

Apesar da menor morbidade e mortalidade das doenças cardiovasculares nos últimos anos, destaca-se a estabilidade ou até mesmo o aumento na prevalência da insuficiência cardíaca em diversos países, muito por conta de aspectos como o envelhecimento populacional e a maior sobrevida com terapias farmacológicas recentes. No mundo, aproximadamente 64 milhões de pessoas são portadores de IC, doença responsável pelo maior número de internação hospitalar em pacientes com mais de 65 anos e, correspondendo a 2% de todas as internações hospitalares no mundo ocidental (1,2). Dados de 2016 no Sistema de Saúde Público Brasileiro demonstram que a IC representa a maior causa cardiovascular de morbidade hospitalar, com 19% das internações por doenças do aparelho circulatório e 12% dos custos das hospitalizações por doença cardíaca (3). Destaca-se também o maior risco de morte súbita pós alta hospitalar deste perfil de pacientes, podendo aumentar em três vezes em comparação a quem nunca foi hospitalizado (4,5). Entretanto, publicações do Registro nacional BREATHE (I Brazilian Registry of Heart Failure) revelam melhorias nos indicadores de cuidado da IC, como a redução no tempo de hospitalização de 22 dias (2011) para 19,5 dias (2016) e a queda no índice de mortes intra-hospitalares de 12% para 9% (6). Ademais, pacientes com IC apresentam recorrentemente uma polifarmácia em seu plano de cuidado, com muitos reduzindo sua adesão terapêutica com o passar do tempo. Soma-se a este, a frequente presença de outras comorbidades clínicas também elevando o risco de pior prognóstico e difícil manejo na prática clínica. A maioria dos casos acompanhados no estudo BREATHE, por exemplo, apresentavam hipertensão arterial (HAS) (74,8%), DM2 em 37,6% dos casos, e doença renal crônica em 21,4%, além de 25,3% dos pacientes internados apresentarem antecedente de infarto agudo do miocárdio.

Ao longo dos últimos anos, terapias farmacológicas capazes de reduzir os efeitos deletérios da hiperativação simpática cardíaca e do SRA intra-renal e sistêmico consolidaram-se como modificadoras de sobrevida nos pacientes com IC. A despeito destes, a resistência insulínica com decorrente disfunção metabólica grave segue como

fator de pior prognóstico na síndrome clínica. Como ilustrado no estudo CHARM (Candesartan in Heart failure - Assessment of mortality and Morbidity), a associação de DM2 e IC com fração de ejeção (FE) preservada ($FE > 50\%$) conferem maior risco de morte por causa cardiovascular (CV) ou hospitalização por IC do que a própria fração de ejeção ventricular esquerda reduzida ($FE < 50\%$) mas sem diabetes (7). Estimativas dos Estados Unidos apontam que a prevalência de DM2 entre pacientes com IC ultrapasse 45%, enquanto a prevalência de IC entre pacientes DM2 oscila entre 10- 23% (8). Nesse contexto, permanece de grande valia reconhecer precocemente a repercussão multiorgânica da IC e mitigar as principais causas de óbito e hospitalização nestes pacientes; com ações como a revisão crítica da polifarmácia instituída e o emprego de terapias com menor proporção de eventos adversos e maior magnitude de benefício para adesão e sobrevida crescentes.

1.2. Disfunção cardíaca e hiperativação neuro-humoral deletéria

Na intenção de guiar os parâmetros terapêuticos e tendo como referência a disfunção sistólica ventricular esquerda, a IC é mais recentemente classificada em quatro subtipos pela Associação Americana de Cardiologia, IC de fração de ejeção do VE preservada - ICPEP ($FEVE >$ ou igual a 50%), IC de fração de ejeção intermediária ou moderadamente reduzida ($FEVE$ entre $41-49\%$), IC de FEVE melhorada (previamente menor que 40% , mas com seguimento evolutivo maior do que 40%) e IC de fração de ejeção reduzida - ICFER ($FEVE < 40\%$) (9). Condição também descrita, mas em menor incidência hoje, os pacientes IC podem evoluir para IC avançada, com disfunção ventricular grave (definida por $FEVE < 30\%$ ou IC direita isolada ou alterações valvares graves não operáveis ou anormalidades congênitas) e na presença de sintomas congestivos persistentes; capacidade reduzida ao exercício e frequente demanda de hospitalizações (10).

A IC pode decorrer de transtornos estruturais ou funcionais cardíacos capazes de prejudicar a capacidade ventricular de se preencher ou ejetar sangue. Em resposta à injúria miocárdica ou à sobrecarga hemodinâmica, diferentes mecanismos compensatórios são acionados para a manutenção do débito cardíaco e da perfusão tecidual. Dentre estes, três mecanismos consolidam esta adaptação, o mecanismo de

Frank-Starling, em que a pré-carga elevada contribui para manutenção do desempenho cardíaco, a ativação de sistemas neuro-humorais, especialmente a liberação de norepinefrina por nervos adrenérgicos, a ativação do sistema renina-angiotensina e a liberação aumentada de vasopressina e endotelina e, mais lentamente, o remodelamento e hipertrofia do miocárdio. À curto prazo, os dois primeiros mecanismos sustentam a função cardíaca no primeiro momento, mas também favorecem a expansão do volume sanguíneo arterial através da retenção de sal e água. Quando cronicamente mantidos, estes mecanismos tornam-se deletérios, promovendo vasoconstrição excessiva, aumento da pós-carga, anormalidades hidroeletrólíticas com potencial arritmogênico, além de efeitos diretos sobre os cardiomiócitos, levando à morte celular e ao remodelamento ventricular patológico (11).

Em contrapartida, outras respostas como a liberação de ANP (peptídeo natriurético atrial) e BNP frente à distensão atrial e ventricular promovem vasodilatação sistêmica, aumento da excreção de sal e água e inibição da atividade simpática (12). Neste contexto, a causa primária da retenção hidrossalina na IC não advém da disfunção renal, mas do subpreenchimento arterial (13). Os rins respondem fisiologicamente a este como se estivessem frente a um cenário de hipovolemia real. A redução da pressão arterial efetiva desencadeia a ativação de barorreceptores no arco aórtico, no seio carotídeo e nas arteríolas aferentes renais, que, por sua vez, estimulam a maior ativação do sistema nervoso simpático (SNS). Este aporte incremental de norepinefrina circulante sob terminais sinápticos eleva o cronotropismo e inotropismo cardíacos, assim como a resistência vascular periférica e renal (14-16). Adicionalmente, a própria elevação do tônus adrenérgico renal também acaba por ativar a cascata de sinalização do SRA, aumentando a secreção de renina pelo aparelho justaglomerular (AJG), e estimulando os núcleos paraventricular e supraóptico no hipotálamo para liberação de vasopressina; que em conjunto e de forma crônica resultam na retenção hidrossalina, congestão

venosa generalizada e expansão do volume extracelular, condições de maior gravidade clínica e prognóstica nos pacientes ICFER (14). (Figura 1)

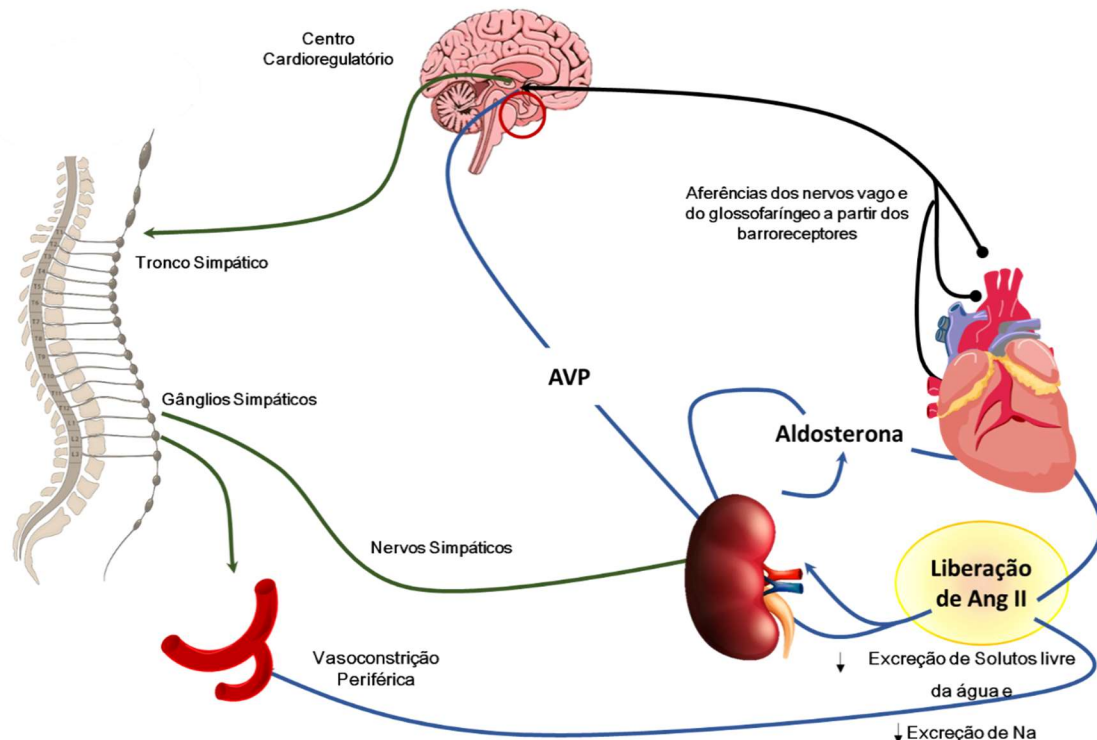


Figura 1. Fisiopatologia da retenção de sódio e água na IC. Descarga de barorreceptores de alta pressão (círculos azuis) no ventrículo esquerdo, carótida, arco sinusal e aórtico gera sinais aferentes (linhas pretas) que estimulam centros cardioreguladores no cérebro, resultando na ativação de vias eferentes no SNS (linhas verdes). O SNS parece ser o integrador primário da resposta vasoconstritora neuro-humoral ao subpreenchimento arterial. A ativação dos nervos simpáticos renais estimula a liberação de renina e ANG II, ativando o RAAS. Concomitantemente, a estimulação simpática dos núcleos supraóptico e paraventriculares no hipotálamo resulta na liberação não osmótica de AVP. A ativação simpática também causa vasoconstrição periférica e renal, assim como a ANG II. A ANG II contrai os vasos sanguíneos e estimula a liberação de aldosterona da glândula adrenal, e também aumenta reabsorção de sódio e causa remodelação de miócitos cardíacos. A aldosterona também pode ter efeitos cardíacos diretos, além de aumentando a reabsorção de sódio e a secreção de potássio e hidrogênio íons no ducto coletor. As linhas azuis designam hormônios circulantes. Adaptado de: Cadnapaphornchai et al Cardiology, 2001 (14)

1.3. Remodelamento ventricular e progressão para disfunção sistólica

O remodelamento ventricular constitui um mecanismo adaptativo frente à sobrecarga pressórica ou volêmica para viabilizar resposta contrátil adequada por meio de fatores mecânicos, neuro-humorais e genéticos (13-15). Embora no início o remodelamento permita manter a função miocárdica, sua progressão conduz inevitavelmente à piora da função e ao declínio prognóstico na IC. Na sobrecarga de

pressão, há estímulo para a síntese de sarcômeros em paralelo com aumento da espessura da parede ventricular e conseqüente hipertrofia concêntrica. Enquanto na sobrecarga de volume, ocorre o aumento dos sarcômeros em série, associado ao deslizamento de feixes de miócitos e conseqüente hipertrofia excêntrica. A hipertrofia cardíaca, quando presente, constitui fator independente de maior morbidade e mortalidade por eventos cardiovasculares. Nesta condição, o aumento desproporcional da matriz intersticial colágena ocasiona a disfunção miocárdica pela menor complacência ventricular e pela modificação da geometria cardíaca (15). Além disto, o crescimento não-proporcional da densidade de vasos leva à diminuição da reserva coronariana, com potencial deficiência de oxigenação e de nutrientes para os cardiomiócitos.

A nível molecular, sabe-se da existência de alterações associadas à transição para a disfunção ventricular, como modificações na regulação e expressão de proteínas contráteis, incluindo a diminuição da expressão da isoforma alfa da cadeia pesada da miosina (alfa-MHC), e o aumento da expressão fetal beta-MHC (de baixa atividade ATPásica). Somam-se a estes a disregulação na homeostase do cálcio, com diminuição da expressão gênica da Ca^{2+} -ATPase (SERCA2), do canal para cálcio do tipo L e aumento da expressão do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, alterando o acoplamento excitação-contração e levando a alterações nas proteínas do citoesqueleto e a dessensibilização beta-adrenérgica. A morte celular através de vias necróticas, apoptóticas e autofágicas perpetuam o remodelamento ventricular patológico por causar a perda de massa contrátil com conseqüente hipertrofia das células miocárdicas e fibrose reparativa (15).

As alterações no volume sistólico e diastólico após um evento isquêmico coronariano são achados frequentes e possuem correlação já demonstrada com maior taxa de eventos adversos (16,17). Por sinal, observou-se em pacientes com IAM prévio menor incidência de eventos cardiovasculares quando a terapia utilizada promovia essencialmente a inibição do remodelamento patológico, obtida nesta ocasião com inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) e beta-bloqueadores(9,18 e 19). Embora os desfechos clínicos de morbimortalidade sejam os “*hard endpoints*” na avaliação das terapias utilizadas no manejo da IC, as medidas de remodelamento cardíaco também se consolidam como desfechos substitutos confiáveis nesta análise. De maneira que os efeitos de novas terapias na estrutura (volumes do VE) e função

(fração de ejeção) também vem sendo estudados e utilizados para definir sua eficácia em reduzir a progressão de doença.

1.4. Dano glomerular e tubular renal na insuficiência cardíaca

A patogênese da congestão venosa e expansão do volume extracelular na IC envolve tanto o decréscimo da taxa de filtração glomerular como o aumento na reabsorção tubular renal de sódio e água.

A queda sustentada na taxa de filtração glomerular é descrita como fator independente de pior prognóstico na IC e guarda associação também com aumento da taxa de hospitalização. Essa piora clínica está frequentemente associada à sobrecarga volêmica persistente, hiperativação neuro-humoral crônica ou mesmo aos efeitos colaterais das principais medicações utilizadas no manejo da IC (20). Os rins possuem mecanismos adaptativos para manutenção da TFG conforme variação da pressão arterial, como a própria autorregulação da microcirculação renal, ajustando resistência arteriolar aferente e eferente, e o feedback túbulo-glomerular, acionado pela variação de sódio e cloreto na mácula densa, com a consequente ação parácrina de adenosina, indutora da vasoconstrição arteriolar aferente no glomérulo.

Em circunstâncias normais, o fluxo sanguíneo renal (FSR) é estimado em cerca de 20% do débito cardíaco, e influenciado pela pressão arterial e venosa renal, a pressão intra-abdominal e pela resistência vascular renal. Frente à redução sustentada do débito cardíaco, ao menor número de glomérulos funcionais e à ação neuro-humoral sustentada de angiotensina II local e sistêmica, observa-se a diminuição do fluxo sanguíneo renal e maior fração de filtração (FF) na IC. Com a progressão da doença e piora hemodinâmica, somam-se a estes, o aumento da pressão venosa central (PVC) e da pressão intra-abdominal e a redução da pressão arterial levando a queda na TFG a níveis ainda mais pronunciados (13) – (Figura 2). Diferentes estudos apontam que o aumento sustentado da PVC reduz o fluxo sanguíneo renal e aumenta a fração de filtração em até 60% (21-24). Neste contexto, terapias com potencial descongestivo e que reduzam a ação de angiotensina II local consolidam-se como medidas de proteção a função glomerular e potencial de maior sobrevida aos pacientes IC.

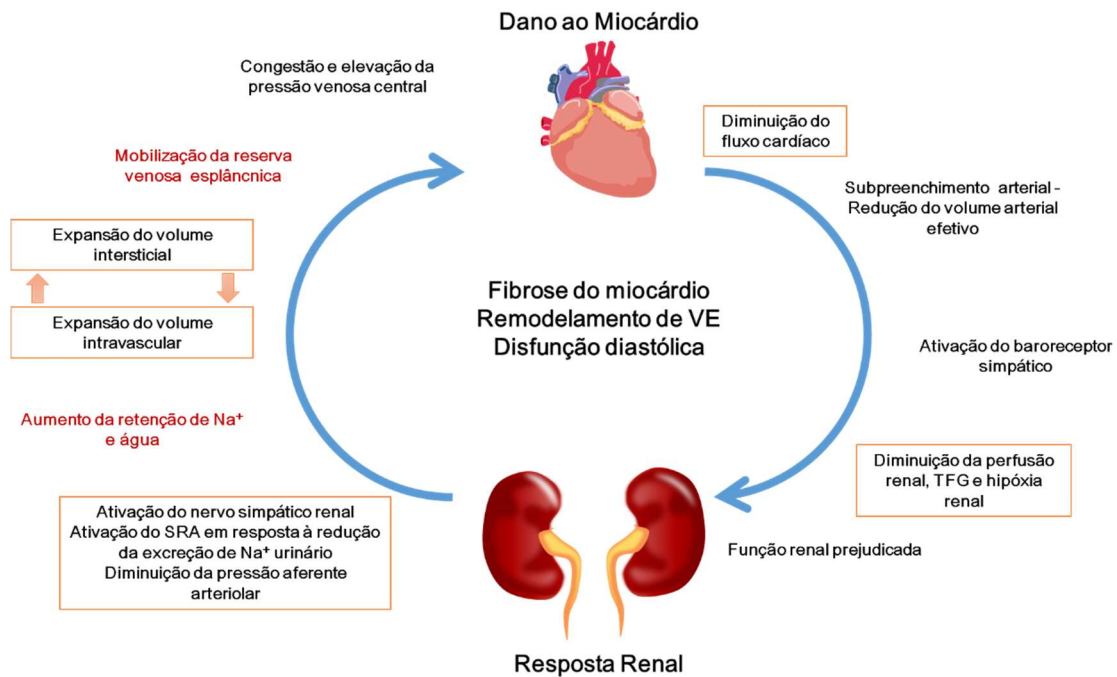


Figura 2 - Interações cardiorenais presentes na progressão da insuficiência cardíaca. Descrita como síndrome caracterizada pela retenção renal de sódio e água com consequente expansão e redistribuição do volume de líquido intravascular e intersticial. Na IC, o rim atua como um respondedor precoce à disfunção miocárdica e ao subpreenchimento arterial com redução do volume sanguíneo circulante efetivo, o que acaba por gerar a ativação de barorreceptores e estimulação neuro-hormonal, promotora de retenção renal de sódio e água. Embora, no curto prazo, a vasoconstrição renal inicial mantenha a pressão de perfusão do órgão, este também evolui com congestão venosa, acúmulo gradual de líquido intersticial, o que suporta uma expansão compensatória do volume plasmático intravascular (PV). Adaptado de Miller LW Circ Heart Failure 2016. (13)

Mais de 65% de todo sódio filtrado é reabsorvido no túbulo proximal (TP) renal. A própria redução do fluxo sanguíneo renal e aumento da fração de filtração elevam a pressão oncótica no capilar peritubular contribuindo para maior reabsorção de sódio. Assim como o aumento da pressão venosa renal e o maior fluxo linfático renal, com consequente menor concentração de proteínas intersticiais e menor pressão coloidosmótica do interstício renal também estimulam esta reabsorção (21) (Figura 3). De forma que na IC em progressão com piora sustentada da TFG, o néfron distal recebe quantidades ainda menores de sódio luminal, o que gera complicações terapêuticas relevantes, por ser esta porção sítio de atuação de medidas descongestivas importantes como diuréticos de alça, tiazídicos ou mesmo mecanismos endógenos como os peptídeos natriuréticos.

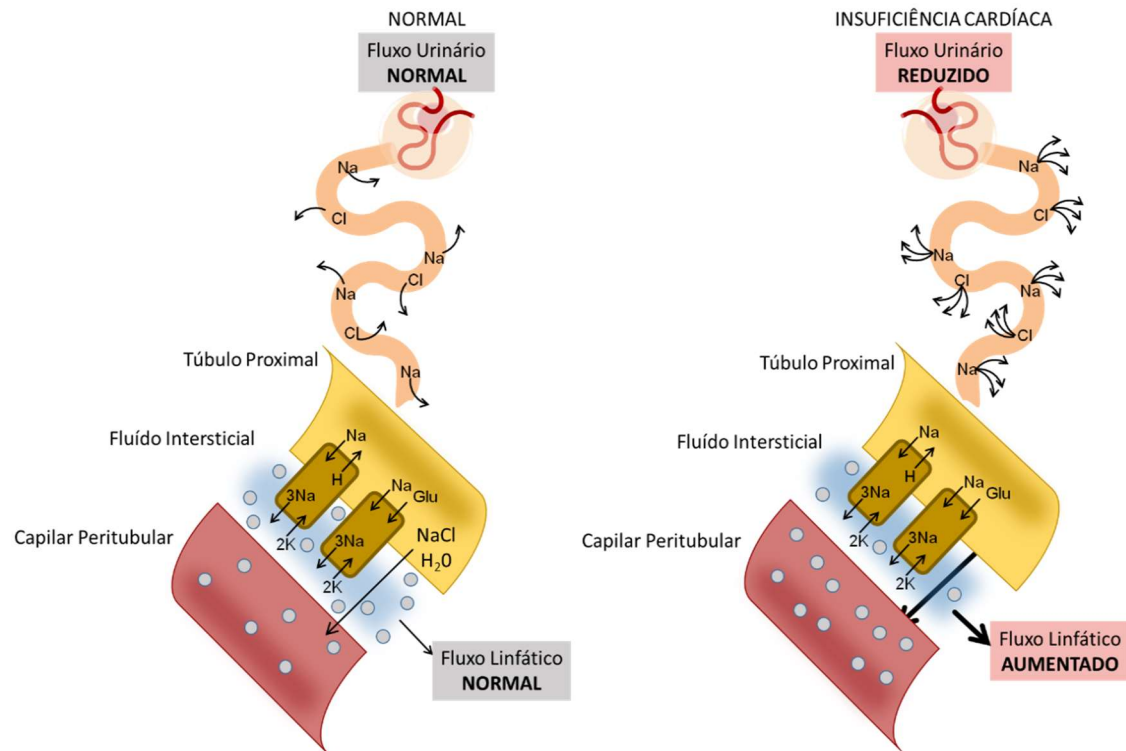


Figura 3 Expansão do volume extracelular e a participação do túbulo proximal renal - Alterações hemodinâmicas e neuro-humorais induzidas na pressão hidrostática e coloidosmótica no interstício renal e nos capilares peritubulares facilitam a reabsorção de Na^+ e água nos túbulos proximais. Além deste, o aumento do fluxo linfático renal gera uma corrente de proteínas intersticiais e diminui a pressão coloidosmótica no interstício renal promovendo ainda mais a reabsorção passiva de Na^+ . Grande parte da quantidade de Na^+ fornecida à porção distal do néfron será substancialmente reduzida. Adaptado de Mullens et al European Heart Journal 2017 (21).

1.5. Expansão do volume extracelular e a participação do túbulo proximal renal

A entrada de sódio pela membrana apical das células tubulares renais representa variável limitante para o transporte transepitelial do fluido hidrossalino (26). Através de estudos com ratos portadores de IC, Torp *et al* demonstraram a expressão aumentada do cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC2), presente no ramo ascendente da alça de Henle e responsável por 20-25% da carga filtrada de NaCl (27). Além disso, acerca do manuseio transepitelial tubular de água, Lutken SC e colaboradores evidenciaram a desregulação de aquaporina (AQP2) no ducto coletor medular renal, o aumento na abundância de aquaporina 2 (AQP2) e p-AQP2 em células principais do ducto coletor medular e redistribuição acentuada de AQP2 e p-AQP2 na membrana plasmática apical

de ratos com IC, contribuindo ainda mais para expansão volêmica intersticial (28). No néfron proximal, a maior parte da reabsorção de Na^+ é realizada através da troca de sódio (Na^+) por hidrogênio (H^+) na membrana apical, via isoforma 3 do trocador Na^+/H^+ (NHE3) (29,30). A modulação da atividade deste trocador, mesmo em pequenas proporções, é capaz de afetar diretamente a homeostase volêmica. Em nosso laboratório, documentamos que a atividade do NHE3 está aumentada em modelo experimental de IC, contribuindo para maior retenção salina e consequente expansão volêmica (31). Sabe-se que estímulos como norepinefrina, angiotensina e aldosterona, tipicamente elevadas na insuficiência cardíaca, aumentam a atividade e a expressão de NHE3 no túbulo proximal (32,33).

Em condições fisiológicas, o NHE3 é fosforilado em um sítio específico (serina 552) pela proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (34,35). Sabe-se que os níveis endógenos desta fosforilação frequentemente estão associados a menor atividade do trocador no TP renal (34,36 e 37). Neste sentido, estudos prévios do nosso grupo demonstraram que, em conjunto da hiperfunção de NHE3 no TP, há também redução da fosforilação na serina 552-NHE3 nos ratos HF em comparação aos ratos Sham. Tal achado, correlaciona-se ainda com a mudança na distribuição subcelular de NHE3, nos ratos HF observa-se ao aumento da expressão de NHE3 nas microvilosidades da “borda em escova” do TP, sugerindo sua provável redistribuição na IC a partir de um pool interno subapical para o corpo das microvilosidades renais (38). Desta forma, estima-se que a fosforilação do NHE3 no sítio específico serina-552 desempenhe um papel importante na distribuição subcelular do trocador e em sua função, contribuindo também para a maior retenção de fluidos característica na IC (39) – Figura 4.

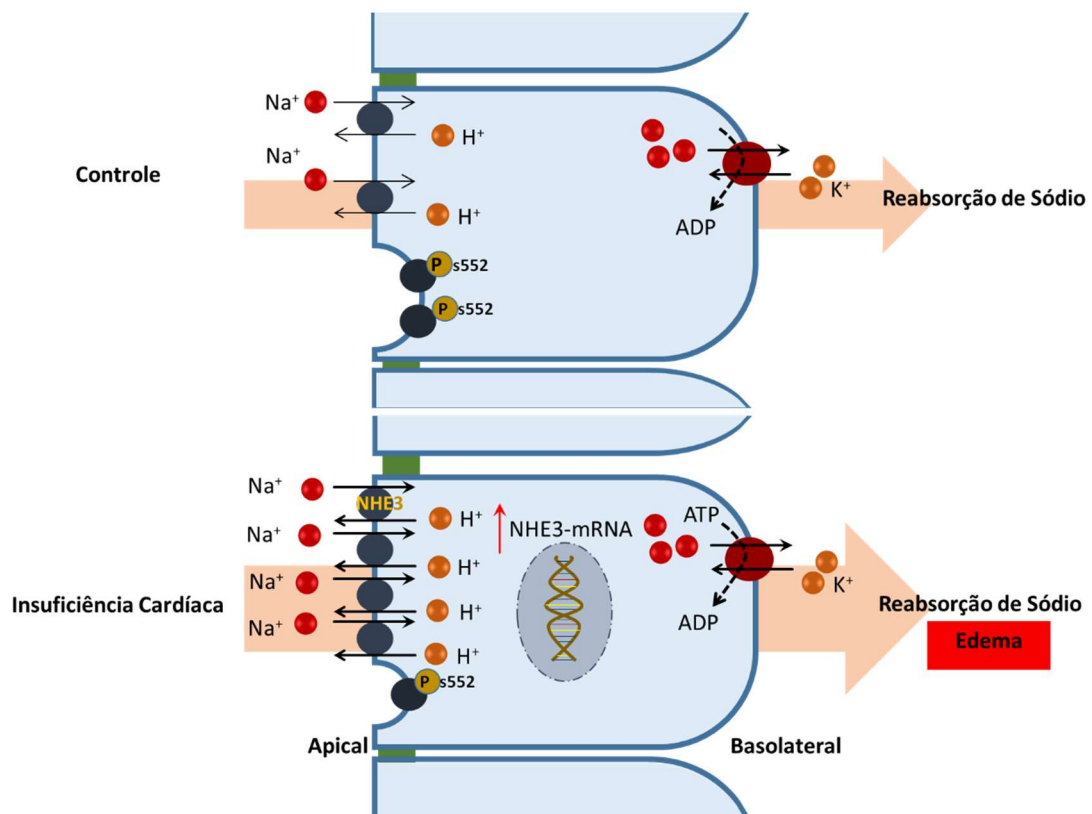


Figura 4. Aumento da atividade e da expressão de NHE3 com menor fosforilação na S552 na fisiopatologia de retenção de fluídos da IC. A maior atividade de NHE3 na IC é acompanhada da maior expressão gênica e da diminuição dos níveis de fosforilação na serina 552-NHE3. Este achado está associado também a maior migração subcelular de NHE3 para a membrana apical, com consequente maior reabsorção de sódio e expansão volêmica. Provavelmente, tal conjunto de disfunções ocorra pela hiperativação sustentada simpática renal e estímulo do sistema renina angiotensina local, além de outros mecanismos neuro-humorais compensatórios estimulados na IC. Girardi et al Am J Physiol Cell Physiol 2012 (38)

1.6. Manuseio renal de glicose e aplicação terapêutica da inibição do cotransportador SGLT2 no tratamento da IC

Em condições fisiológicas, o rim reabsorve toda a glicose filtrada pelos glomérulos. O cotransportador SGLT2, codificado pelo gene SLC5A2 e expresso nos segmentos S1 e S2 do túbulo proximal, reabsorve 97% da glicose filtrada, restando ao cotransportador SGLT1 reabsorver os 3% restantes no segmento S3 (40,41). A passagem da glicose da célula tubular proximal para o interstício ocorre através de transportadores de glicose (GLUT1 e 2), presentes na membrana basal (42) (Figura 5).

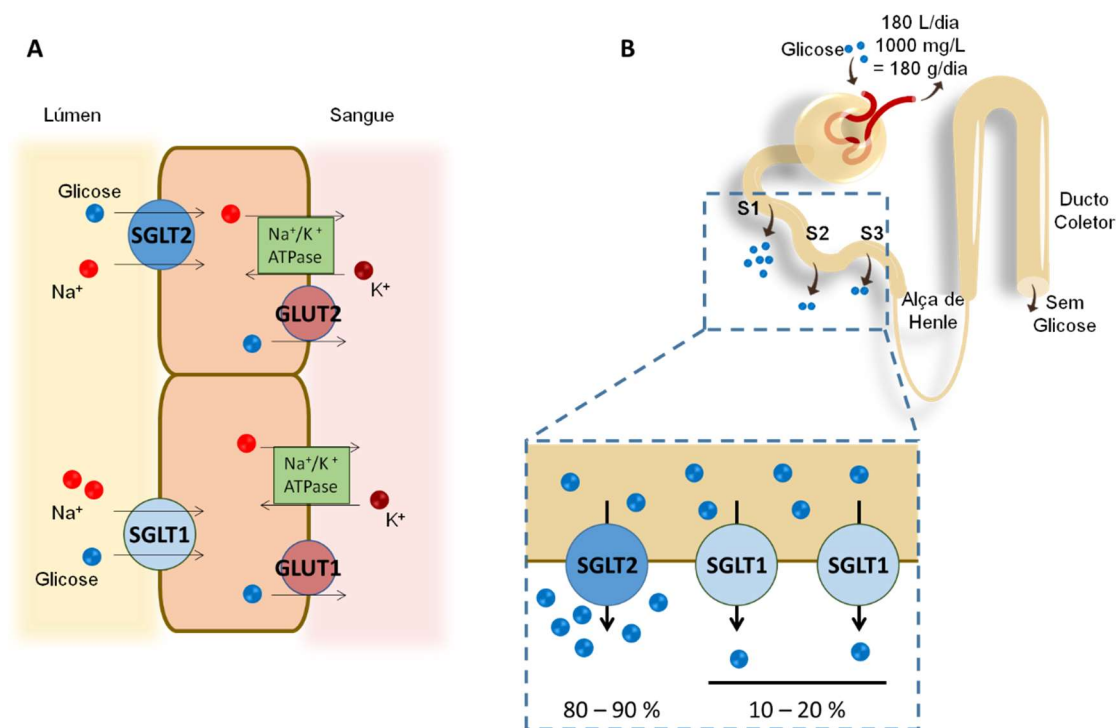


Figura 5. Manuseio de glicose no túbulo proximal. A) A bomba de Na +K +ATPase, presente na membrana basolateral do túbulo proximal, provém o transporte de sódio-glicose, com o efluxo de sódio e o aumento de potássio intracelular. Conforme a redução da concentração de sódio intracelular, este íon é internalizado passivamente junto a glicose via cotransportadores SGLTs. Uma vez internalizada, a glicose se desloca contra o gradiente de concentração em direção ao espaço intersticial, através dos transportadores GLUT. SGLT2 e GLUT2 representam um mecanismo conjunto de transporte, semelhante a SGLT1 e GLUT1. B) O ritmo de filtração glomerular normal consiste em cerca de 180 litros por dia (125mL/min). Com a média glicêmica por volta de 100mg/dl, os rins filtram 180g de glicose por dia, e mesmo assim, em condições fisiológica, não apresentamos glicosúria. Nesse cenário, a absorção de glicose é realizada em sua maior parte (80-90%) pelo cotransportador localizado no segmento S1 do túbulo proximal, e o restante, reabsorvido por SGLT1 nos segmentos distais S2/S3. Adaptado de DeFronzo et al Nature Reviews Nephrology 2016 (42).

A história dos inibidores de SGLT2 inicia-se em 1835 com os experimentos do químico Christopher Petersen que isolou a florizina da casca da raiz da macieira e a testou para o tratamento de malária (43). Em 1886, o professor alemão Josef Von Mering descobriu os efeitos glicosúricos da florizina com redução nos níveis de glicose plasmática (44). No entanto, somente em 1960, foi demonstrado que a reabsorção de glicose ocorria por transporte ativo secundário utilizando o gradiente eletroquímico do

íon sódio como força movente. Consequentemente, notou-se que quando a reabsorção mediada por este transportador era inibida, sódio e glicose seguiam excretados na urina. Posteriormente, os pesquisadores Francisco Alvarado e Robert Crane estudando mecanismos de absorção de glicose intestinal, demonstraram que a florizina atua como inibidor competitivo não seletivo do transporte ativo de sódio e glicose (45). Em testes com ratos hiperglicêmicos na Universidade de Kyoto e Tanuba Seigy em 1996 foram desenvolvidos os análogos de florizina, primeiros inibidores seletivos de SGLT2 (46). Haja vista a relevante atuação do néfron proximal na reabsorção de glicose e o mecanismo de ação das gliflozinas independente de insulina e específico no TP, passou-se então a considerar a inibição seletiva de SGLT2 como forte estratégia para melhor manejo do DM2. Hoje, o uso dos iSGLT2 consolidam-se não somente como terapia efetiva de controle glicêmico, mas também para redução da hipervolemia e melhor evolução clínica na IC.

Em situações de hiperglicemia crônica, observa-se, a hiperexpressão de SGLT2 nas células do TP como resultante de mecanismo mal adaptativo que acaba por levar a manutenção da hiperglicemia (47,48). A hiperexpressão de SGLT2 aumenta também a reabsorção de sódio no túbulo proximal, reduzindo a carga deste íon na mácula densa, que por sua vez, ativa mecanismos de vasodilatação arteriolar aferente (via óxido nítrico, adenosina) e vasoconstrição eferente (SRA), propagando o aumento da pressão intra-glomerular e do TFG, condições precursoras da nefropatia diabética (49). Com o uso dos iSGLT2, e menor reabsorção de sódio proximal e maior aporte à mácula densa, restaurando o feedback túbulo-glomerular com vasoconstrição arterial aferente e redução da pressão intraglomerular (Figura 6).

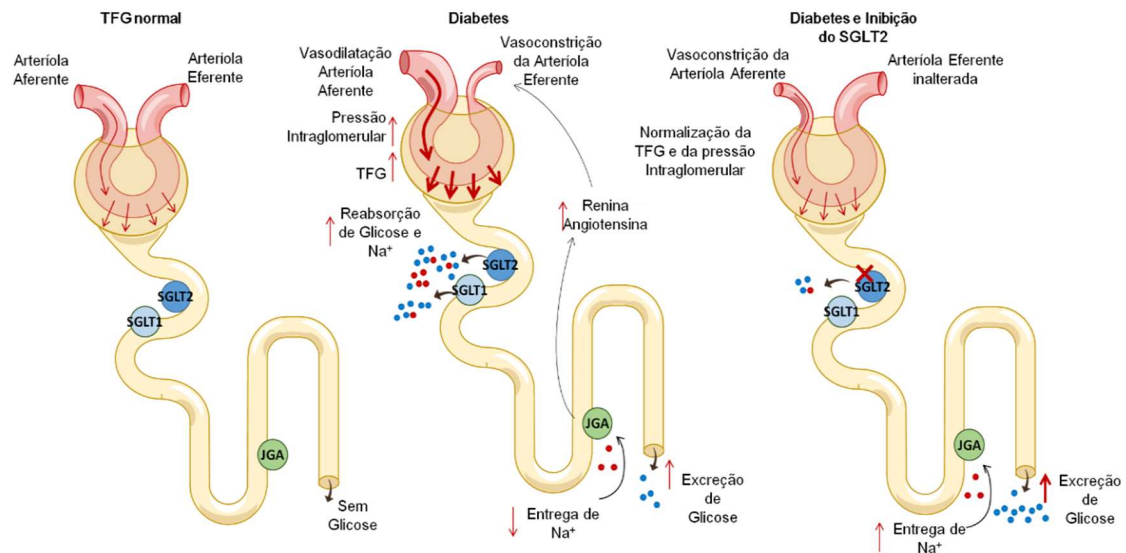


Figura 6. Efeitos do DM2 e da inibição de SGLT2 nas arteríolas aferentes e eferentes, na TFG e na excreção de sódio. A) Em indivíduos normoglicêmicos, a glicose filtrada é logo em seguida reabsorvida através de SGLT2 e SGLT1, como resultado, não há glicosúria ou mesmo estímulos ao aparelho justaglomerular (AJG) – B) Em situações de hiperglicemia crônica, a quantidade de glicose filtrada encontra-se aumentada e observa-se também a maior expressão de SGLT2 e SGLT1, com subsequente reabsorção elevada de glicose e sódio. A maior reabsorção salina reduz os níveis de sódio entregues distalmente no AJG, gatilho para ativação de componentes intrarenais do SRA e de outros mecanismos neuro-humorais como adenosina e óxido nítrico, levando à vasoconstrição arteriolar eferente e vasodilatação aferente, respectivamente. A consequência direta deste rearranjo hemodinâmico é o aumento da pressão intraglomerular e da TFG, que cronicamente acaba por levar ao dano glomerular. C) O tratamento com inibidores de SGLT2 em pacientes DM2 aumenta o aporte de glicose e sódio ao néfron distal, ao AJG, gerando em último plano a redução da pressão intraglomerular e a preservação da TFG. Adaptado de DeFronzo et al Nature Reviews Nephrology 2016 (42).

A magnitude dos benefícios clínicos associados ao uso dos iSGLT2 demonstrada em diversos ensaios clínicos nos últimos anos ultrapassa os marcadores do controle glicêmico e encontra valor na diminuição de mortalidade, redução da hospitalização por IC e no retardo da progressão da doença renal crônica. (50) Desfechos clínicos apresentados primeiramente com pacientes DM2 no estudo EMPA-REG OUTCOME (*Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes*)), ensaio clínico de alto risco CV (51) e posteriormente reafirmados nos estudos CANVAS (*Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study*) (52) e no DECLARE-TIMI 58 (*Dapagliflozin Effect on Cardiovascular Events*) (53) com pacientes de menor risco CV. Desenhados à época como investigação de não inferioridade, acabaram por evidenciar a superioridade do acréscimo das gliflozinas ao manejo padrão com benefício precoce e sustentado de menor mortalidade cardiovascular e redução de internação hospitalar

por IC, já evidenciados nos primeiros 2 a 3 meses do tratamento. A não elucidação dos mecanismos responsáveis para tal e a magnitude do seu efeito nefro e cardioprotetor independentes das alterações em hemoglobina glicada levantaram uma série de questões acerca do provável desfecho positivo também em situações clínicas normoglicêmicas (54,55). O estudo DAPA-HF foi o primeiro a avaliar pacientes com IC e fração de ejeção reduzida independente da presença de DM2, e demonstrou que a dapaglifozina reduz taxa de internação por IC e morte por causa cardiovascular mesmo em pacientes sem DM2. Posteriormente, a sequência com os estudos EMPEROR-R (*Empagliflozin Outcome Trial in Patients with Chronic Heart Failure and a Reduced Ejection Fraction*) (56), EMPEROR-P (*Empagliflozin Outcome Trial in Patients with Chronic Heart Failure and a Reduced Ejection Fraction*) (57) e DELIVER (*Dapagliflozin Evaluation to Improve the Lives of Patients With Preserved Ejection Fraction Heart Failure*) (58) aprofundaram a perspectiva de que os inibidores de SGLT2 retardam a evolução e a progressão da IC, em pacientes de alto risco, tanto naqueles com FEVE < 40% como em pacientes com FEVE preservada com ou sem DM2.

Nos dias atuais, as gliflozinas consolidaram a mudança de fármaco anti-hiperglicemiante para uma das classes de medicamentos modificadoras de sobrevida na IC. Em 11 ensaios clínicos envolvendo mais de 75 mil pacientes, a inibição crônica de SGLT2 produziu reduções consistentes de 20% a 25% no composto de morte cardiovascular ou hospitalizações por IC. Vale mencionar que grande parte deste desfecho combinado é impulsionado pela menor taxa de internação por IC descompensada, resultado com redução de risco de 27 a 39% e encontrada em todos os CVOT publicados até aqui.

1.7. Prováveis mecanismos pelos quais os inibidores de SGLT2 podem gerar efeitos de nefro e cardioproteção na insuficiência cardíaca – Racional do estudo

Sítio de expressão predominante dos cotransportadores sódio-glicose 2 (SGLT2), o túbulo proximal renal reúne funções fundamentais na homeostase volêmica ao reabsorver quase a totalidade da glicose filtrada, e aproximadamente dois-terços de toda a carga de sódio que passam pelos glomérulos, via trocador NHE3. Diferentes linhas

de evidências atestam a favor da provável interação entre NHE3 e SGLT2. Através da administração sistêmica de inibidor não seletivo de SGLTs, florizina, Pessoa et al documentaram o aumento da excreção urinária de sódio e bicarbonato e realizaram estudos com microperfusão tubular proximal corroborando a redução da atividade de NHE3 pela adição de florizina, a despeito da ausência de glicose (59). Ademais, estudos de imunofluorescência evidenciaram a colocalização do trocador NHE3 com o cotransportador SGLT2, mas não com o SGLT1, na membrana apical do túbulo proximal renal. Tais achados sugerem a existência de uma interação funcional entre o NHE3 e SGLT2, unificando funcionalmente, no TP renal, a regulação do volume extracelular com a homeostase glicêmica (59,60).

Diante da ampla influência do túbulo proximal renal no manuseio hidrossalino e glicêmico em condições fisiológicas e na fisiopatologia da IC, este estudo visa testar a hipótese de que os inibidores de SGLT2 possam exercer efeitos de cardio e nefroproteção em ratos normoglicêmicos com IC, e mais especificamente elucidar se a inibição seletiva de SGLT2 é capaz de reduzir a atividade do trocador NHE3 no TP.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral: Testar a hipótese de que o uso de inibidores de SGLT2 promove benefícios cardíacos e renais em ratos não diabéticos com insuficiência cardíaca e investigar os processos envolvidos.

Objetivos Específicos

- i. Testar a hipótese de que a empagliflozina atenua a disfunção ventricular na IC não diabética;
- ii. Testar a hipótese de que a empagliflozina preserva a TFG em ratos com IC não associada ao DM2;
- iii. Testar a hipótese de que a empagliflozina reduz a atividade do NHE3 no túbulo proximal de ratos com IC não diabéticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Modelo experimental de Insuficiência Cardíaca

Os experimentos foram realizados seguindo os princípios éticos em pesquisa do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovados pela Comissão Institucional de Cuidados e Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 941/2018).

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizados ratos machos Wistar com oito semanas de idade (Peso 200-250 g) (n = 104), obtidos no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e mantidos no biotério do Instituto do Coração, Hospital das Clínicas (FMUSP), sob condições de controle de temperatura (22°C), de umidade (60%) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Toda a maravalha e sabugo de milho utilizados com os animais foram autoclavados, a água filtrada e a ração controlada da marca Nuvilab® CR-1. Não houve restrição do acesso à ração, exceto nos períodos de jejum para coleta de sangue e nas 8 horas antecedentes à eutanásia.

O experimento foi conduzido conforme descrição nos desenhos experimentais ilustrados nas Figuras 6 e 7.

Os ratos foram randomicamente designados para cirurgia fictícia “Sham” (n = 36) ou infarto do miocárdio (IM) (n = 68) por ligadura da artéria descendente anterior esquerda (ADA) (61), sendo que estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardíaca, UNIFESP – EPM, colaboração do Professor Paulo José Ferreira Tucci. Inicialmente, os ratos foram anestesiados com quetamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal e colocados sob ventilação com pressão positiva (frequência: 90 respirações/minuto; volume: 2,5 ml em um respirador de roedores Harvard [modelo 683, Harvard Apparatus Co]). Em seguida, foram mantidos sob monitoramento eletrocardiográfico (ECG) com dois eletrodos colocados nas patas dianteiras e um na pata traseira esquerda. Este monitoramento era realizado antes, durante e depois dos procedimentos. Após a tricotomia do hemitórax esquerdo, seguia-se para a toracotomia lateral em topografia onde o coração gera maior impulso à palpação. Com o animal em posição supina, foi realizada a incisão da pele e a divulsão dos músculos peitorais e intercostais, com auxílio de pinça Kelly curva. Após divulsão da

musculatura intercostal, as costelas foram afastadas para realizar a pericardiotomia e a visualização direta da artéria descendente anterior (ADA) com a utilização de pinça anatômica. Para a indução do infarto por oclusão, a ADA foi ligada a aproximadamente três milímetros de sua origem no tronco coronário esquerdo, por meio de fio de sutura nylon 5,0. Após checar os resultados da sutura por visualização direta e repercussão eletrocardiográfica, o afastador era retirado e promovia-se a hiperinsuflação pulmonar via ventilação positiva para posterior sutura do tórax em bolsa previamente preparada em torno das bordas da incisão. Em seguida, o animal era mantido em ventilação artificial enriquecida com oxigênio até recuperação ventilatória espontânea para posterior extubação. Os ratos “Sham” foram submetidos a um procedimento cirúrgico semelhante, exceto pela ligadura da artéria coronária ADA. Após a recuperação da cirurgia, todos os ratos eram mantidos em um ambiente com temperatura e umidade controladas com um ciclo claro/escuro de 12 horas no Biotério do Instituto do Coração com ração e água fornecidos *ad libitum*.

3.1.1. Análise de função cardíaca por ecocardiograma transtorácico e BNP sérico

Quatro semanas após a cirurgia (fase pré-tratamento), a IC foi caracterizada por avaliação ecocardiográfica da função sistólica do ventrículo esquerdo (VE) e pela concentração sérica do peptídeo natriurético cerebral (BNP). O estudo ecocardiográfico (ECO) foi realizado para estimativa de alterações estruturais como funcionais. Após anestesia e tricotomia da face anterior do tórax, os ratos foram sedados com mistura de isoflurano 2% por via inalatória e posicionados em decúbito lateral esquerdo. Três eletrodos foram colocados em suas patas, duas dianteiras e uma traseira, para obtenção do traçado eletrocardiográfico simultaneamente à realização do exame. As imagens foram capturadas e analisadas usando o equipamento de ultrassom Sonos 5500 (Philips Medical System) com um transdutor de 12-14 MHz (2 cm de profundidade com fundamental e harmônico imagem). Foram utilizadas as janelas paraesternal esquerda (corte longitudinal e transversal) e apical (quatro câmaras e duas câmaras), para obtenção dos seguintes dados: área diastólica final do ventrículo esquerdo (ADFVE) e área sistólica final do ventrículo esquerdo (ASFVE) para cálculo da variação fracional da

área (FAC), seguindo a fórmula: $FAC = [(ADFVE - ASFVE) / ADFVE] \times 100$. Tais medidas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização da Sociedade Americana de Ecocardiografia (62). A indução de IC foi considerada quando a FAC (porcentagem de mudança na área transversal do VE entre a diástole e a sístole) foi inferior a 40% e os níveis circulantes de BNP foram superiores a 1,0 ng/mL. Os ratos infartados que desenvolveram IC (n = 38) e os ratos “Sham” (n = 36) foram aleatoriamente divididos em dois grupos e tratados com empagliflozina (processada junto a ração, na dose de 10mg/kg/dia – conforme protocolo e produção junto a empresa RHOSTER®, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil) ou não tratados, mantidos com veículo. Após quatro semanas (fase pós-tratamento), os ratos foram conduzidos para eutanásia, submetidos a anestesia por meio de injeção intraperitoneal de quetamina e xilazina e subsequente extração dos órgãos. O desenho do estudo é representado nas Figuras 7 e 8.

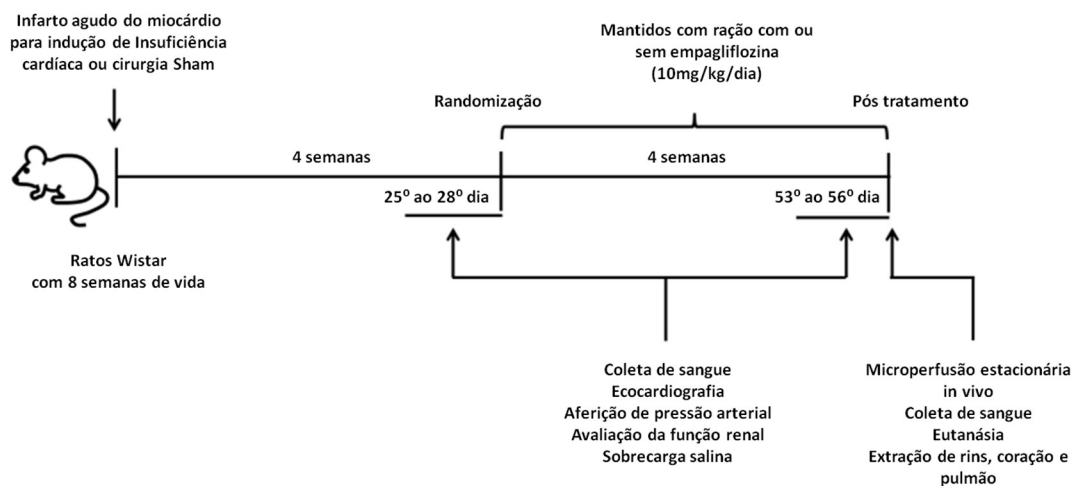


Figura 7. Desenho esquemático do estudo - A cirurgia de oclusão da artéria descendente anterior ou a cirurgia fictícia foram realizadas no tempo t= 0, em seguida os ratos foram mantidos em gaiolas no biotério do InCor. Com 4 semanas após o procedimento cirúrgico, foram realizadas análises ecocardiográficas, gaiola metabólica, coleta de sangues e os ratos divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento administrado (HF, Sham, HF Empa e Sham Empa). Ao final do estudo, os ratos foram novamente alojados em gaiolas metabólica, realizado nova análise ecocardiográfica e análise *in vivo* da microperfusão estacionária do túbulo proximal renal. Por fim, foram eutanasiados para remoção do sangue e tecidos para posteriores análises biométrica e histológica.

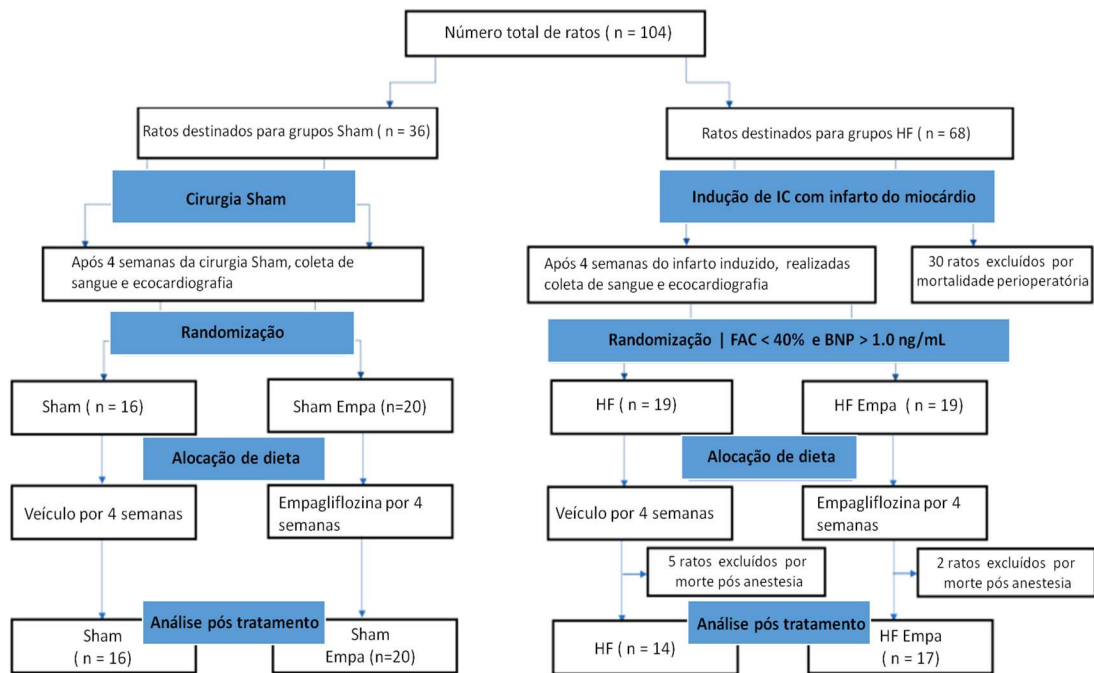


Figura 8. Diagrama CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials) adaptado para estudo experimental, grupos HF e Sham com tratamento randomizado - Fluxograma de indução do infarto do miocárdio, recrutamento e certificação da evolução com insuficiência cardíaca sistólica, randomização em quatro grupos, alocação de dieta processada com empagliflozina e posterior análise biométrica, funcional e metabólica.

3.1.2. Determinação dos níveis séricos de BNP

Para determinação dos níveis séricos de BNP na fase pré-tratamento, amostras de sangue foram retiradas do seio retro-orbital dos animais sob anestesia com isoflurano. Enquanto no pós-tratamento, o sangue foi coletado do abdômen, via punção da artéria aorta no momento da morte. As amostras foram imediatamente transferidas para tubos de vácuo com separador de gel (BD vacutainer SST II Advance, Becton, Dickinson and Company) e centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C para obtenção do soro. Os níveis séricos de BNP foram medidos por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Kit Elisa BNP 32 Rat, Abcam) de acordo com as instruções do fabricante.

3.2. Aferição indireta da pressão arterial

A aferição da pressão arterial (PA) foi realizada por meio de pletismografia caudal, experimento não invasivo de aquisição de valores pressóricos em ratos acordados, utilizando um pletismógrafo, BP-2000 Série II (Visitech Systems®). Para obtenção dos valores de PA, o equipamento utiliza a fotopletismografia por transmissão de luz, em que a variação na quantidade de luz transmitida através da cauda é exibida na tela do computador, convertida em valores e analisada para determinar a pressão arterial e a pulsação do rato. Assim, quando o sangue arterial chega à cauda e os vasos se dilatam rapidamente, observa-se maior dispersão da luz na cauda do animal, indicativo de sístole. À medida que a pressão desse sangue diminui, os vasos da cauda se contraem e dispersam a luz em menor intensidade, momento correspondente à diástole (63).

Com o equipamento previamente calibrado, os ratos foram acondicionados em contensores sobre plataforma aquecida e ventilação adequada, e a cauda, em seguida, encaixada a um manguito de borracha conectado a um esfigmomanômetro. O protocolo estabelecido para aquisição dos valores de PA inclui três dias de adaptação ao equipamento e dois dias de aferição. Nos dois dias de aferição, são anotadas as médias de uma sequência com no mínimo 10 medidas de PAS, e variação máxima de 15 mmHg. A pletismografia de cauda fornece valores de PAS e PAD, porém utilizamos apenas os valores de PAS, pois o sinal da diastólica é frequentemente de menor intensidade e por isso, pode ser pouco fidedigno ao valor real. Ao final do protocolo, o valor considerado de PA para cada rato foi a média entre os valores obtidos nos dias de aferição. Este procedimento foi realizado antes do início do tratamento e na última semana do estudo, fase pós-tratamento.

3.3. Mensuração de glicemia em jejum

Na fase pré-tratamento e após o último dia de tratamento, a glicose plasmática foi medida após os animais serem mantidos em jejum de aproximadamente 8 horas. A concentração de glicose no sangue foi medida instantaneamente com tiras teste e aparelho Accu-Check Performa® (Roche Diagnostics GmbH).

3.4. Avaliação da função renal

Para monitoramento do consumo de água, ração e fluxo urinário, os ratos foram alojados individualmente e colocados em gaiolas metabólicas (Tecniplast, Buguggiate) tanto na fase pré-tratamento como no pós-tratamento, seguindo descrição em literatura (64). A urina foi coletada por 24 horas com auxílio de um funil acoplado a um recipiente com óleo mineral em sua base, para impedir a evaporação da parte aquosa da urina coletada. Ao término das 24 horas, a urina foi armazenada em tubo Falcon®, centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos, aliquotada em microtubos e armazenada em freezer -20°C. Estas amostras foram coletadas e utilizadas para determinar o fluxo urinário, sódio, creatinina, proteinúria e glicosuria. Desta forma, os seguintes parâmetros metabólicos foram avaliados:

- i. Ingestão de Água: representa o consumo de água livre por dia corrigido pelo peso do rato, resultados são expressos em mL/kg/24h.
- ii. Ingestão de Ração: representa o consumo de ração por dia corrigido pelo peso corpóreo do rato. Os resultados são expressos em g/kg/24h.
- iii. Fluxo urinário: a partir do volume urinário, o fluxo urinário foi obtido por gravimetria, pesando-se o volume urinário total coletado durante o intervalo de 24 horas e normalizando este pelo peso de cada animal, com resultado expresso em mL/kg/24h.
- iv. Excreção urinária de glicose: medida por meio do kit da LabTest Diagnóstica, seguindo as instruções do fabricante, com reação também realizada em duplicata e normalizada pelo peso de cada animal e resultados expressos em (mg/kg/24h)
- v. Excreção urinária de sódio: concentrações determinadas por fotometria de chama (Digimed DM-62), normalizadas pelo peso de cada rato e expressas em mEq/kg/24h
- vi. Proteinúria / creatinina urinária: a concentração da excreção de proteínas na urina foi avaliada utilizando o kit Sensiprot, LabTest (Lagoa Santa, MG), a reação foi feita em duplicata e de acordo com as instruções do fornecedor. Em seguida, os valores obtidos foram padronizados pelo fluxo urinário e pelo peso corporal

dos ratos. E por fim, corrigidos pelos valores de creatinina urinária, visando minimizar as diferenças na TFG.

Em periodicidade semelhante, antes e após a terapia com gliflozina ou tratamento com veículo, coletas de amostra sanguínea foram realizadas por meio da punção infraorbital, com os animais previamente anestesiados com isoflurano, na intenção de quantificar sódio, creatinina e ureia séricos e também o hematócrito dos animais. Os valores de hematócrito foram medidos a partir da análise direta no aparelho ABL800 Flex (Radiometer, Copenhagen), com resultado expresso em porcentagem de volume dos eritrócitos no volume total de sangue.

As concentrações de sódio tanto no soro como urinário foram determinadas por fotometria de chama (Digimed DM-62) enquanto as concentrações de uréia e creatinina séricas foram medidas por métodos colorimétricos usando kits Labtest.

O clearance de creatinina foi utilizado para estimar a taxa de filtração glomerular, com as concentrações urinárias de creatinina determinadas utilizando-se o kit Labtest Ref. 35. O ensaio, feito em duplicata de acordo com as instruções do fabricante, baseia-se na reação da creatinina com a solução de ácido pícrico em meio alcalino. Para as dosagens de creatinina sérica foram realizados ensaios pelo método de Jaffé modificado. Adicionou-se 100µL de ácido sulfúrico 1,84%, 100µL de tungstato de sódio 10% e 200µL de água a 100µL de soro. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4000g, com 200µL de sobrenadantes transferidos para uma placa de 96 poços com o acréscimo de 80µL de ácido pícrico 2% e 20µL de hidróxido de sódio a 10%. A absorbância foi lida em um espectrofotômetro de leitor de placas (Spectra-max190-Molecular Devices). A concentração de creatinina sérica foi calculada em relação à curva padrão de creatinina e expressa em mg/dL. A taxa de filtração glomerular foi obtida por meio do clearance da creatinina, calculado pela fórmula $(UCr \times V / PCr)$, sendo UCr correspondente à concentração urinária de creatinina, V o fluxo urinário e P a concentração sérica de creatinina. Os resultados foram expressos em mL/min/kg.

3.5. Teste de sobrecarga salina

Para realização do teste de sobrecarga salina e análise de manejo hidrossalino, os animais foram anestesiados com isoflurano e por via intraperitoneal administrado um volume de solução salina aquecida (37°C) (0,9% NaCl) equivalente a 10% do peso total.

Em seguida, os ratos foram colocados imediatamente em gaiolas metabólicas, onde eles rapidamente acordavam. O volume de urina coletado por 3 horas foi medido com uma pipeta graduada. A concentração urinária de sódio neste experimento também foi medida por análise de fotometria de chama (Digimed DM-62). Os resultados foram expressos como porcentagem da carga de fluido e sódio injetada.

3.6. Análise biométrica e morfométrica

Após análise funcional cardiometabólica e término das quatro semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados e os órgãos (pulmão, rins e coração) foram removidos. Para tal, os ratos foram anestesiados com quetamina e xilazina (50mg/kg e 10 mg/kg respectivamente) e, em seguida, submetidos à exposição da cavidade abdominal por laparotomia, coleta de sangue arterial por punção direta da artéria aorta e posteriormente eutanasiados por decapitação. Após a eutanásia dos ratos, o primeiro órgão a ser removido foi o pulmão direito, o qual foi isolado por ponto com fio de algodão em torno do hilo pulmonar para evitar perdas de fluidos durante a manipulação. Em seguida, o pulmão foi imediatamente pesado em balança analítica obtendo-se assim o peso úmido deste órgão (PU). A fim de se obter o peso seco do pulmão (PS), o órgão foi colocado em estufa a 70°C durante 72 h e, em seguida, pesado novamente em balança analítica. A relação peso úmido e seco do pulmão foi utilizada para estabelecer o teor de água do pulmão, padrão comumente utilizado como marcador de congestão pulmonar e foi calculado pela seguinte fórmula: $\text{Teor de água no pulmão} = (PU - PS) / \text{Pulmão úmido} \times 100$. Em seguida, o coração foi removido, descartou-se a base e os vasos do órgão e os ventrículos direito e esquerdo foram separados e pesados em balança analítica. Os rins foram imediatamente removidos para isolamento de proteínas corticais renais para imunoblotting, fixação de tecidos para imuno-histoquímica e congelamento para extração de RNA e RT-PCR quantitativo, descritos a seguir. Os pulmões, coração e rins foram extraídos e pesados, com o peso destes órgãos normalizado pelo comprimento da tíbia esquerda.

As carcaças dos ratos foram mantidas em câmara fria, localizada no biotério do Instituto do Coração e embaladas em sacos específicos para o descarte de material biológico. Sendo o recolhimento deste material realizado pela prefeitura de São Paulo e conduzido para local adequada à sua incineração.

3.7. Análise da hipertrofia miocitária

Para análise da hipertrofia cardíaca, foi estimado o volume nuclear médio dos cardiomiócitos, a partir de amostras do miocárdio do VE de cada animal, com análise escolhida para segmentos distantes da área de infarto induzido (septo e parede posterior). Os cortes histológicos foram corados com *Hematoxilina & eosina de Harris* e as fibras musculares cardíacas cortadas longitudinalmente para visualização com aumento de 400 vezes (objetiva de 40x e ocular de 10x). Foram medidos exclusivamente os núcleos totalmente visíveis, concentrados principalmente no mesocárdio, localizados no centro da célula e de formato elipsoide. Os núcleos com corte em sentido transversal ou oblíquo não foram considerados para análise. Para cada animal estudado foram medidos de 70 a 90 núcleos, avaliados num total de seis campos de 75.000 μm^2 cada. E para cálculo do volume nuclear foi utilizada a equação (65):

$$\text{Volume nuclear (V)} = \pi \times D \times d^2 / 6$$

sendo d, o menor diâmetro do núcleo e D, o maior diâmetro medido.

3.8. Avaliação de fibrose intersticial cardíaca

Para análise do teor de colágeno no interstício do miocárdio, os cortes foram corados pelo método do *Picrossírius red* com imersão por uma hora em solução contendo 0,1% de sírius red F3BA, em meio aquoso saturado de ácido pícrico. Em seguida, foram lavados em solução 0,01 N de ácido clorídrico (HCl) por dois minutos, desidratados com álcool etílico e diafanizados com xilol. O teor de colágeno no miocárdio ventricular esquerdo foi estimado (66) desprezando-se as mensurações em áreas perivascular e cicatricial do infarto. Após captar as imagens, foram detectadas as regiões coradas em vermelho vibrante, composto por tons de vermelho, verde e azul com padronização na mesma faixa de tons (red: 200 a 250, green: 120 a 160, e blue: 130 a 180). A análise foi realizada com objetiva de 20 vezes e ocular de 10 vezes (ampliação de 200x). Foram avaliados de oito a dez campos de cada animal, capturados do septo interventricular e parede posterior (remotos ao infarto), com resultados expressos em percentagens da área ocupada por fibras colágenas em relação a área total de tecido.

3.9. Análise imunohistoquímica de α -actina de músculo liso no tecido cardíaco remanescente ao infarto

O processo de injúria tecidual cardíaca modula a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, células com características de músculo liso que expressam a proteína α -actina de músculo liso (α -SMA). Para análise desta evolução diferencial, cortes de 4 μ m de espessura dos quatro grupos foram colocados em lâminas silanizadas e em seguida, realizado a desparafinização em xilol. Para hidratação dos cortes, as lâminas foram colocadas em uma sequência de álcool absoluto, álcool 95° e álcool 70° e em seguida lavadas em água corrente, água deionizada e deixadas em tampão fosfato (PBS) pH 7,4. O passo seguinte foi a recuperação dos sítios antigênicos em solução de ácido cítrico 10 mM pH 6, com o bloqueio de peroxidase endógena realizado com água oxigenada 10v (3%). Em seguida, as lâminas foram incubadas “overnight” com o anticorpo primário diluído actina músculo liso (1:1000) e depois, incubadas com o anticorpo secundário Biotinilado ABC Elite (Vector Laboratories Inc cód. PK6102). Como cromógeno, utilizou-se a diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) e logo após, realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Harris. A análise pós preparo foi realizada em microscópio de luz com aumento de 400x, utilizando o software Quantimet Leica®. Para cada lâmina, foram analisados 20 campos, com o resultado expresso como média da área marcada para α -SMA por campo.

3.10. Preparação do homogenato de proteínas de córtex renal

Após a retirada dos rins, a cápsula renal foi removida com o auxílio de pinça e tesoura cirúrgica. O rim direito foi cortado longitudinalmente e as porções referentes ao córtex e medula foram separadas. O córtex renal foi transferido para frascos contendo solução tampão de fosfato-salino (PBS) gelado pH 7,4, constituído por 150 mM NaCl; 2,8 mM fosfato monobásico; 7,2 mM fosfato de sódio dibásico. Nesta solução, foram adicionados os inibidores de protease (0,7 ug/mL pepstatina A, 0,5 ug/MI leupeptina e 40 ug/mL PMSF) e os inibidores de fosfatase (50 mM pirofosfato de sódio decahidratado e 15 mM fluoreto de sódio). Estes tecidos foram homogeneizados com homogeneizador de tecidos (POLYMIX® PX-SR50E, Kinematica Inc.). O homogenato foi então dividido em

alíquotas para o freezer -80°C e alíquotas em tubos para ultracentrífuga. A determinação da concentração de proteínas foi obtida através do método de Lowry (67).

3.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS para proteína e immunoblotting

A separação das proteínas foi realizada utilizando géis de 7,5% de poliacrilamida-SDS, seguindo Laemmli *et al* (68). As amostras de proteínas foram ressuspendidas em 50 µL de tampão de amostra para eletroforese (pH 6,8; 62,5 mM tris-HCl; 10% SDS; 20% glicerol; 1,96% β-mercaptoetanol; 0,01% azul de bromofenol). Em seguida, o conteúdo foi aplicado no gel imerso em tampão de eletroforese (pH 8,8; 25 mM tris-base; 192 mM glicina), juntamente com um padrão de massa molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope Bio-Rad®). O gel de corrida foi preparado com concentração de acrilamida 7,5% e o gel de empilhamento foi preparado a 3%.

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, as proteínas do gel foram transferidas para membrana PVDF (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore®) previamente hidratada com 100% metanol e equilibrada em tampão de transferência (25 mM tris-base, 192 mM glicina, 20% metanol). Para a transferência, foi utilizado o sistema de sanduíche (GE Healthcare®, TE62), submerso, overnight e a 4°C. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau (solução contendo 0,1% Ponceau Sigma e 10% ácido acético) para a visualização das bandas. Em sequência, a membrana foi bloqueada em solução de bloqueio [contendo 5% de leite em pó desnatado; tampão (150 mM NaCl; 2,8 mM fosfato de sódio monobásico; 7,2 mM fosfato de sódio dibásico); 0,1% Tween 20; água milli Q q.s.p.] ou BSA [solução contendo 5% de albumina sérica bovina (BSA); tampão (pH 7,4; 50 mM tris-base; 150 mM NaCl); 0,1% Tween 20; água milli Q q.s.p.] e mantidas com anticorpos primários específicos: anticorpo policlonal contra SGLT2 (1:1.000; NBP1-92384, Novus Biologicals), anticorpo monoclonal (mAb) contra NHE3, clone 3H3 (1:1.000; Peter Aronson, Yale University), anticorpo fosfoespecífico contra NHE3, PS552-NHE3, clone 14D5(34) (1:1.000; Santa Cruz Biotech) ou anticorpo policlonal contra β-actina (1:5.000; ab8227, Abcam). As proteínas foram detectadas usando anticorpos secundários conjugados com a enzima peróxido de hidrogênio oxidoreductase (1:2.000; Jackson ImmunoResearch). Os anticorpos ligados foram detectados usando um sistema de quimioluminescência (GE Healthcare) de

acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A visualização das bandas foi realizada por meio de um fotodocumentador (GE Healthcare®, ImageQuant LAS 4000) e analisadas por densitometria usando o software Image J®.

3.12. Imuno-histoquímica renal

O rim esquerdo foi cortado ao meio no plano sagital mediano, fixado em formol a 10% por 24 horas, seus fragmentos armazenados em etanol 70% e posteriormente incluídos em parafina. Quatro cortes micrométricos de rim em parafina foram incubados com 3% de H₂O₂ por 3 minutos (cinco vezes a temperatura ambiente) para bloquear a atividade da peroxidase endógena e depois enxaguar com TBST (solução salina tamponada com Tris (TBS) com 0,1% Tween 20). As reações inespecíficas foram bloqueadas em soro de cabra a 2% por 20 minutos e depois incubadas com o anticorpo policlonal de coelho anti-SGLT2 (1:100) ou o anticorpo monoclonal de coelho anti-caspase-3 ativada (1:100; 9661, Cell Signaling Technology). Depois de 18 horas de incubação a 4°C, os cortes renais foram lavados 3 vezes por 5 minutos com TBST e incubados com um anticorpo secundário. Após a lavagem em TBST, foram incubados com kit de polímero conjugado a peroxidase, solução anti-coelho (Histofine Simple Stain MAX PO(MULTI), Nichirei Biosciences Inc) por 30 minutos em temperatura ambiente. Depois de lavar com TBST, as imunorreações foram detectadas com 3,3'-diaminobenzidina tetracloridrato (DAB-Zymed) por 7 minutos e contra coradas com hematoxilina. As imagens foram adquiridas sob uma luz de ampliação de 400x microscópio usando o software (Quantimet Leica, Leica Biosystems).

3.13. Detecção de apoptose celular por marcação terminal de dUTP-biotina mediada por desoxinucleotidil transferase terminal - TUNEL (*Terminal Transferase-Mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling*)

O método TUNEL é usualmente utilizado para detectar a fragmentação do DNA resultante de cascatas de sinalização apoptóticas. A desoxinucleotidil transferase terminal é utilizada para adicionar a dUTP marcada, em uma maneira independente do molde e para as 3 principais terminações OH de uma fita única ou dupla de DNA. A desoxinucleotidil transferase terminal corta a marcação final (TUNEL) e realça a apoptose marcada em um único nível celular, tornando-a mais sensível que a

eletroforese em gel de agarose para análise da fragmentação do DNA. Para este fim, foi utilizado o kit de detecção de morte celular in situ (ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit S7100, Merck Millipore), seguindo as instruções do fabricante. Os cortes de tecido foram desparafinizados em xileno e etanol, reidratados em diluições seriadas de etanol e permeabilizados com proteinase K. Seguiu-se para a reação com desoxinucleotidil transferase terminal e a conversão da fosfatase alcalina, posteriormente, as seções transversais foram examinadas no microscópio de luz. Ao final, as porcentagens de núcleos TUNEL-positivos foram quantificadas por um observador cego para as quatro condições utilizando o software Quantimet-Leica (Leica Biosystems, Wetzlar).

3.14. RT-PCR Quantitativo em Tempo Real

O RNA total foi isolado do rim esquerdo usando Trizol (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante, quantificado (ND-1000 espectrofotômetro-NanoDrop Technologies, Inc.) e tratados com DNase-I. A síntese de DNA complementar foi realizada usando Super-Script III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) seguindo as orientações do fabricante.

As reações foram realizadas usando SYBR Green PCR Master Mix-PE (Thermo Fisher Scientific) em um Sistema de Detecção de Sequência Rápida ABI Prism 7500 (Aplicado Biosystem). O método de ciclo de limite comparativo foi usado para análises de dados e todas as amostras ensaiadas em triplicata. As transcrições para três genes de referência (Gapd, Actb e Ppia) foram determinadas conforme descrito na Tabela 1 e utilizamos o software BestKeeper(69) para identificar o melhor gene referência (GAPDH) para normalização de dados sob nossas condições experimentais, sendo a expressão relativa analisada pelo método C_T comparativo.

Tabela 1. Sequência de primers utilizados

Gene	Sequencia do Primer de 5' para 3'	Pares de bases
<i>Gapdh</i>	F - ATGGTGAAGGTCGGTGTG R – GAACTTGCCGTGGGTAGAG	162
<i>Actb</i>	F - CGTTGACATCCGTAAAGACC R – GCCACCAATCCACACAGA	172
<i>Ppia</i>	F - AATGCTGGACCAAACACAAA R – CCTTCTTTCACCTTCCCAAA	101
<i>Slc5a2</i>	F - TGAGTGGAATGCGCTCTTTG R – GAGGCATGGTAATCACTCCG	86
<i>Slc9a3</i>	F - CATGAGCTGAATTTGAAGGATGC R – GCTGAAGTCCACATTGACCAT	114

Gapdh - Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; *Actb* - Beta-actin; *Ppia* - Peptidylprolyl Isomerase A (cyclophilin A); *Slc5a2* - Solute Carrier Family 5 Member 2 (SGLT2); *Slc9a3* - Solute Carrier Family 9 Member A3 (NHE3); F - forward; R - reverse

3.15. Microperfusão estacionária in vivo

A microperfusão estacionária in vivo foi utilizada para determinar a atividade do NHE3 no túbulo proximal e para testar a hipótese de que a inibição seletiva de SGLT2 seria capaz de reduzir a atividade de NHE3 no TP de ratos HF. Para isso, ratos Wistar (4-5/grupo) foram anestesiados com uma injeção intramuscular de Zoletil (tiletamina + zolazepam) associado à Xilasina (50 e 5 mg/kg/mL, respectivamente), seguido de incisão na porção ventral do pescoço para realizar a traqueostomia. Logo depois, a jugular esquerda foi canulada para infundir solução fisiológica com 3 % manitol, a 0,05 mL/min, mediante bomba de infusão contínua (Harvard Apparatus Compact Infusion) com o intuito de tornar os túbulos mais visíveis. Feito isso, os ratos tiveram o rim esquerdo exposto, fixado e imobilizado com solução de Ringer Agar 5 % in situ em um suporte. Como fonte de luz, utilizou-se uma lâmpada de projetor de tungstênio que teve sua luz canalizada ao rim através de um bastão de quartzo e, os túbulos renais observados utilizando-se um aumento de 40 a 100 vezes. Durante todo o procedimento, o rim foi

banhado por solução Ringer a 37 °C, a cauda do rato seccionada na extremidade e mergulhada em béquer contendo solução salina, mantendo contato elétrico por ponte de ágar + 3 M KCl com uma hemicélula de Ag/AgCl. Após este preparo, foram iniciados os experimentos de microperfusão estacionária conforme descrição prévia (70). Para a medida do pH intratubular foi utilizado um microeletrodo duplo contendo em um ramo 1 M KCl corado com verde-FDC (referência) e, no outro ramo, resina neutra de troca iônica sensível ao H⁺ (Fluka Chemika) sendo o restante do ramo preenchido com solução de complemento (130 mM NaCl; 10 mM Na₂HPO₄; 10 mM NaH₂PO₄, pH 7,0). Para o preparo das micropipetas duplas foram utilizados capilares duplos tipo Theta (R & D. Optical Systems, Inc.) contendo um ramo preenchido com óleo de rícino corado com Sudan-black e outro ramo preenchido com a solução perfusora tubular [100 mM NaCl; 25 mM NaHCO₃; 5 mM KCl; 1 mM CaCl₂; 1,2 mM MgSO₄; rafinose (0,6 g/10mL)] corada com verde-FDC a 0,05 %. Tanto as micropipetas quanto os microeletrodos foram manipulados por meio de micromanipuladores mecânicos (Leitz, Wetzlar). Posteriormente, a taxa de acidificação tubular proximal foi avaliada por meio de medidas contínuas do pH intratubular, por um microeletrodo duplo introduzido em um túbulo proximal que estivesse com a solução perfusora isolada do fluido tubular por duas gotas de óleo (Figura 9). A diferença de potencial entre os dois ramos deste microeletrodo é gerada pelo pH do fluido onde o microeletrodo está imerso, enquanto a diferença de potencial transepitelial corresponde à diferença entre o ramo de referência e a terra. Conseqüentemente, o compartimento extracelular do animal constituía o potencial de referência para as medidas de voltagem transepitelial, entre o microeletrodo de referência intratubular e o compartimento extracelular.

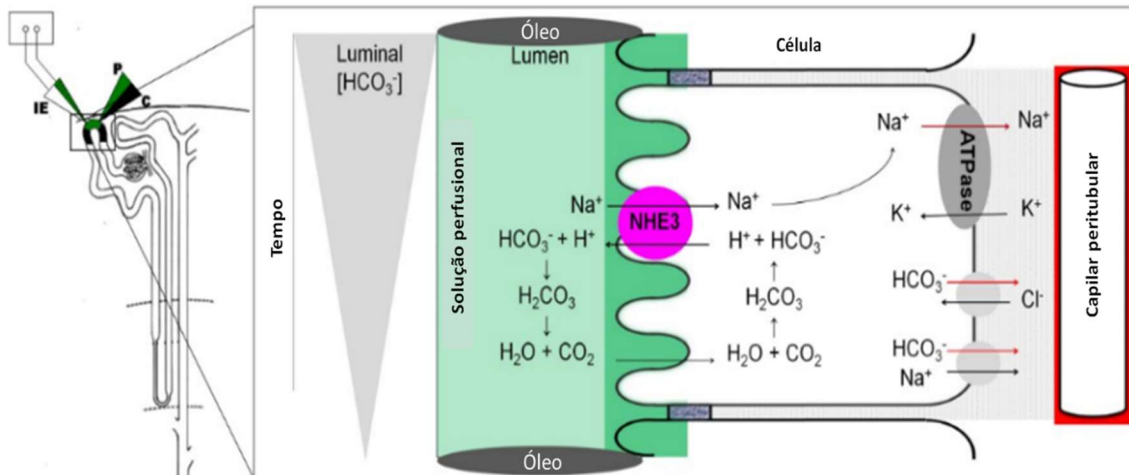


Figura 9 Microperfusão de fluxo interrompido de segmentos de túbulos proximais renais **in vivo**. Direita: micropipeta de cano duplo. Esquerda: Microeletrodo sensível a íon H^+ . O pH intratubular foi medido injetando uma gota da solução de perfusão luminal ($\text{pH} = 8$) entre 2 colunas de óleo e seguindo as mudanças de pH intratubular em direção ao nível de estado estacionário. A partir dos valores de pH intratubular e pCO_2 sistêmico, as concentrações intratubulares de HCO_3^- foram calculadas em intervalos de 1s utilizando a equação de Henderson-Hasselbach.

As voltagens foram lidas por um voltímetro de alta impedância de entrada (electrometer, Model FD223-F, WPI), cuja saída era continuamente registrada por um polígrafo ECB de dois canais. Estes valores foram então digitalizados em intervalos de 1 s por microcomputador AT 386 (Dell 333D) acoplado a um conversor analógico digital (Data Translation DT 2801), através do qual os dados foram adquiridos (Figura 10) e processados. O programa de aquisição de dados foi elaborado a partir do software Asyst (Asyst Software Technologies Inc.). Os valores de pH para cada ponto do registro foram calculados por interpolação a partir das curvas de calibração dos eletrodos. A taxa de acidificação tubular foi medida pela injeção de uma gota da solução de perfusão entre as colunas de óleo e seguindo as mudanças de pH luminal em direção ao nível de estado estacionário.

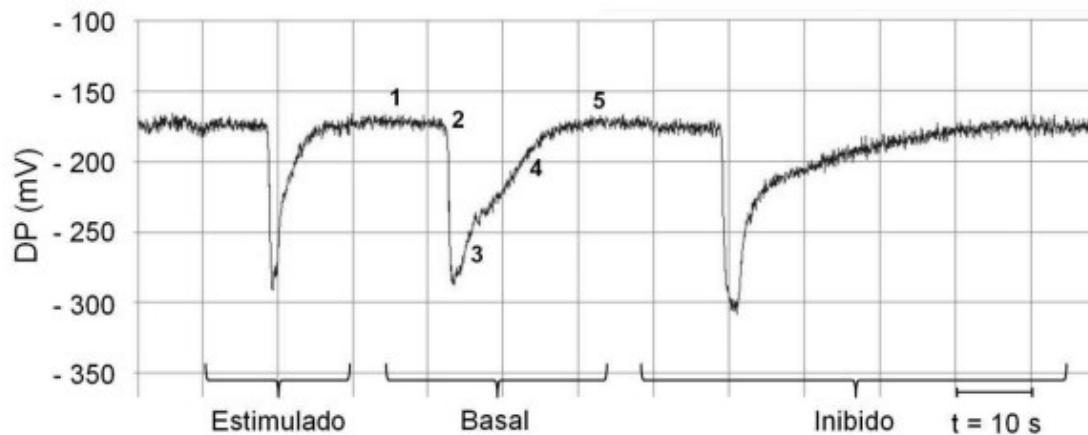


Figura 10 Representação de curvas obtidas durante os experimentos de microperfusão estacionária in vivo em túbulo proximal renal. A curva representa o registro do potencial obtido pelo eletrodo durante a perfusão tubular de uma solução controle, a partir de uma que estimula e outra que inibe a atividade do transportador. Em 1, está o potencial que representa o pH tubular inicial. Em 2 é o momento no qual a solução de interesse é perfundida no túbulo. Em 3, está representada a recuperação do pH dependente de CO₂. Em 4, a recuperação do pH dependente de transportadores de H⁺. Em 5, o potencial do pH estacionário no fim da perfusão.

A taxa de acidificação tubular ($t_{1/2}$) foi calculada como a meia vida da redução da concentração do íon bicarbonato (HCO₃⁻) injetado ao nível estacionário. O nível de reabsorção de HCO₃⁻ ($J_{\text{HCO}_3^-}$) foi calculado através da equação:

$$J_{\text{HCO}_3^-} = k [(\text{HCO}_3^-)_i - (\text{HCO}_3^-)_s] \times r/2$$

onde k é a constante de redução de bicarbonato na luz [$k = \ln 2 / (t_{1/2})$], $t_{1/2}$ é a meia vida da reabsorção de bicarbonato, r é o raio tubular e $(\text{HCO}_3^-)_i$ e $(\text{HCO}_3^-)_s$ são as concentrações de HCO₃⁻ injetada e a nível estacionário, respectivamente. A acidificação luminal também foi avaliada na presença ou ausência do inibidor seletivo de NHE3, S3226 (10 μM) (71) e na solução de perfusão de controle. Para avaliação da cinética de acidificação, os valores luminiais [H⁺] de cada curva de recuperação de pH foram ajustados com o Origin 2020 usando a seguinte equação:

$$[\text{H}^+]_{(t)} = \frac{[\text{H}^+]_{\text{stat}}}{(1 + b \cdot e^{-k \cdot t})}$$

onde $[H^+]_{stat}$ representa $[H^+]$ luminal estacionário, k representa a constante cinética intrínseca de cada curva ajustada, e b é uma constante que determina os valores iniciais de pH para cada curva e pode ser matematicamente definida como

$$b = \frac{[H^+]_{stat}}{[H^+]_0} - 1$$

Em seguida, calculamos a taxa de acidificação luminal até o ponto médio-máximo de cada curva por

$$\Delta [H^+] / \Delta t = \frac{[H^+]_{\text{ponto médio - max}} - [H^+]_0}{t_{1/2}}$$

onde $t_{1/2}$ é o tempo previsto naquele ponto [$t_{1/2} = \ln(b)/k$] e

$$[H^+]_{\text{ponto médio - max}} = [H^+]_{stat} / 2$$

3.16. Análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), com n indicando o número de ratos. As comparações entre as médias foram avaliadas utilizando a análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Tukey. O nível de significância foi estabelecido para valores de $p < 0,05$. Para análise comparativa e elaboração gráfica, utilizamos o programa GraphPad Prisma versão 7.04 para sistema operacional Windows 10.

4. RESULTADOS

4.1. A empagliflozina reduz os níveis séricos de BNP, a hipertrofia do ventrículo direito e a relação peso pulmonar/comprimento da tibia em ratos HF não diabéticos

Para documentar a evolução para IC consolidada e a resposta diferencial pós empagliflozina, foram realizadas análises a partir dos níveis séricos de BNP e da evolução da disfunção ventricular contrátil (FAC) na fase de pré-tratamento e pós-tratamento. Conforme mostrado na Figura 11A e 11C, os dois grupos HF apresentaram níveis médios similares de BNP sérico de $1,38 \pm 0,08$ ng/ml e $1,44 \pm 0,12$ ng/ml e FAC de $23 \pm 2\%$ e $20 \pm 2\%$ no período de pré-tratamento. No pós-tratamento, os ratos HF exibiram um aumento nos níveis de BNP em comparação com o período pré-tratamento ($2,13 \pm 0,25$ vs. $1,38 \pm 0,08$ ng/ml, $p < 0,001$) (Figura 11A-B). Por outro lado, ratos HF Empa exibiram níveis séricos de BNP reduzidos em sua evolução ($0,87 \pm 0,06$ vs. $1,44 \pm 0,12$ ng/ml, $p < 0,001$) (Figura 11A-B). Vale mencionar que o tratamento com empagliflozina além de reduzir, restaurou o BNP sérico para níveis semelhantes aos dos animais Sham (Figura 11B). Observou-se também a diminuição significativa da FAC em ratos HF, do pré ao pós-tratamento (23 ± 2 vs. $17 \pm 1\%$, $p < 0,05$) (Figura 11C-D), e em combinação com o aumento no BNP sérico, reforçando a evidência de deterioração da função cardíaca neste grupo. Em contraste, o tratamento com empagliflozina induziu um efeito modesto, mas de melhora significativa na FAC no mesmo intervalo comparativo (20 ± 2 vs. $25 \pm 1\%$, $p < 0,05$) (Figura 11C-D). Complementarmente, os níveis séricos de BNP e FAC foram similares entre ratos Sham e Sham Empa e não diferiram entre os períodos de pré-tratamento e pós-tratamento.

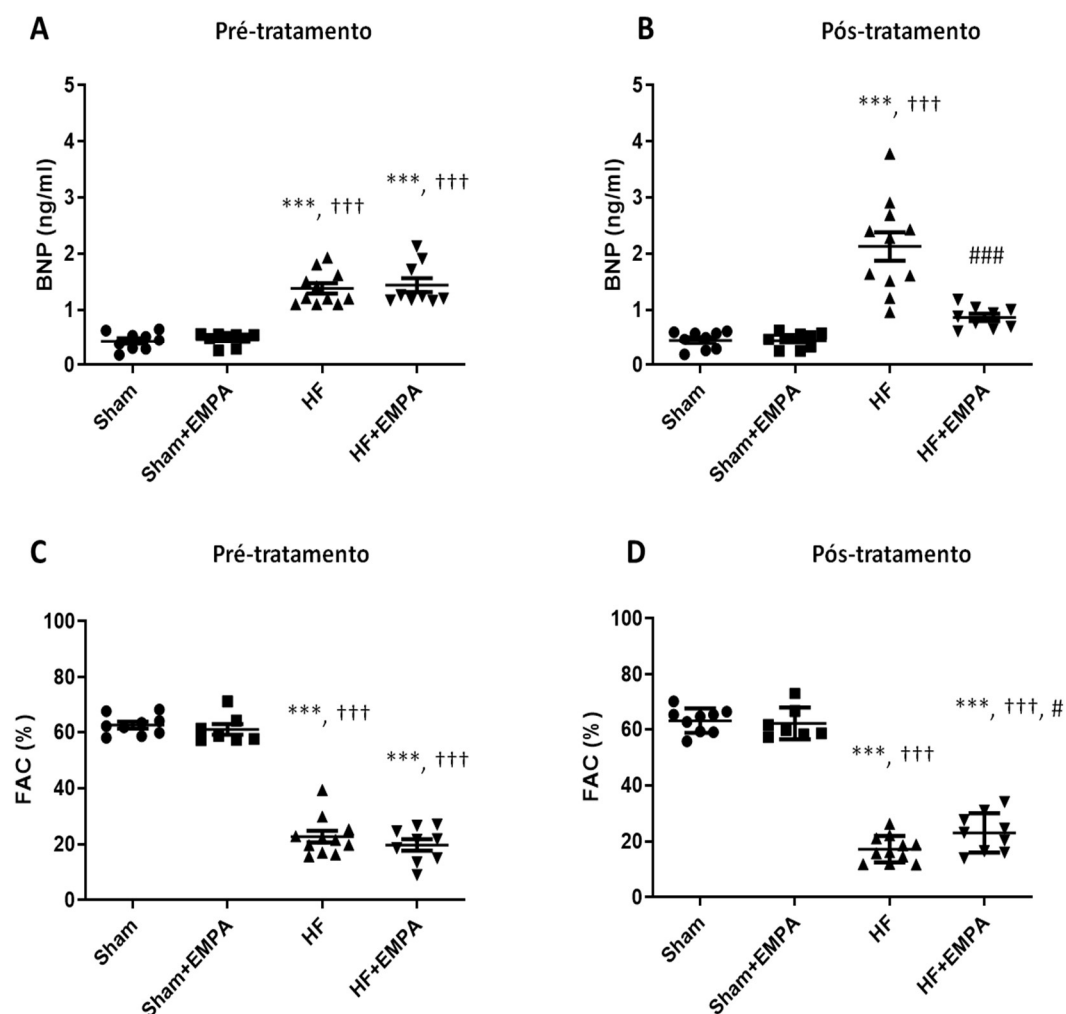


Figura 11. O tratamento com Empa normaliza a concentração sérica de peptídeo natriurético cerebral (BNP) e melhora discretamente a função sistólica do VE em ratos não diabéticos com insuficiência cardíaca. A análise ecocardiográfica e a determinação quantitativa do BNP sérico foram realizadas 4 semanas após o infarto do miocárdio ou cirurgia fictícia (pré-tratamento) e após 4 semanas de tratamento com EMPA ou veículo (pós-tratamento). Os níveis circulantes de BNP medidos em ratos HF e Sham em (A) pré-tratamento e em (B) pós-tratamento. A variação de área fracional (FAC) em ratos HF e Sham está representada em (C) pré-tratamento e (D) pós-tratamento. Valores expressos como média \pm EPM. *** $p < 0,001$ vs. Sham; # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ vs. HF; ††† $p < 0,001$ vs. Sham Empa.

Em relação à análise biométrica dos animais, o ganho médio de peso corporal foi similar entre ratos HF, HF Empa e Sham Empa, mas estatisticamente diferentes do grupo Sham. Diante desta diferença, o peso dos órgãos foi normalizado pelo comprimento da tibia, medida inalterada entre os quatro grupos. Avaliamos também a evolução de hipertrofia cardíaca e observamos que ratos HF exibiram maior relação entre peso do VD/comprimento da tibia, maior razão entre pulmão/comprimento da tibia e maior congestão pulmonar do que os grupos Sham. Em contrapartida, a empagliflozina

preveniu a congestão pulmonar e a hipertrofia do ventrículo direito nos ratos HF Empa. Em relação ao peso normalizado do ventrículo esquerdo, não houve diferença entre os grupos HF, tratados ou não tratados com empagliflozina (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros biométricos de ratos Sham e HF tratados com o inibidor SGLT2 empagliflozina (EMPA) ou veículo

	Sham (n = 16)	Sham Empa (n = 20)	HF (n = 14)	HF Empa (n = 17)
Peso corpóreo pré-tratamento	370 ± 10	362 ± 10	359 ± 6	372 ± 7
Peso corpóreo pós-tratamento	450 ± 10	403 ± 10**	398 ± 5**	406 ± 9
Ganho ponderal (%)	19,4 ± 3,5	9,9 ± 2,2*	12,7 ± 1,5*	8,8 ± 1,4**
Comprimento da tíbia (mm)	41,2 ± 0,3	40,4 ± 0,3	40,5 ± 0,2	40,7 ± 0,4
VE / tíbia (mg/mm)	20,4 ± 0,8	17,6 ± 0,4**	20,1 ± 0,5†	20,6 ± 0,4††
VD / tíbia (mg/mm)	6,26 ± 0,24	5,22 ± 0,16	8,90 ± 0,96***,†††	6,39 ± 0,30###
VD + VE / tíbia (mg/mm)	26,7 ± 1,1	22,8 ± 0,5**	29,0 ± 1,1†††	27,0 ± 0,6††
Pulmão / tíbia (mg/mm)	32,2 ± 1,5	31,8 ± 1,1	44,7 ± 3,3***,†††	31,7 ± 1,7###
Teor de água no pulmão (%)	78,3 ± 0,4	77,9 ± 0,4	80,6 ± 0,2***,†††	79,1 ± 0,3###
Rim E + Rim D / tíbia (mg/mm)	64 ± 1	67 ± 1	58 ± 1**,†††	67 ± 1###

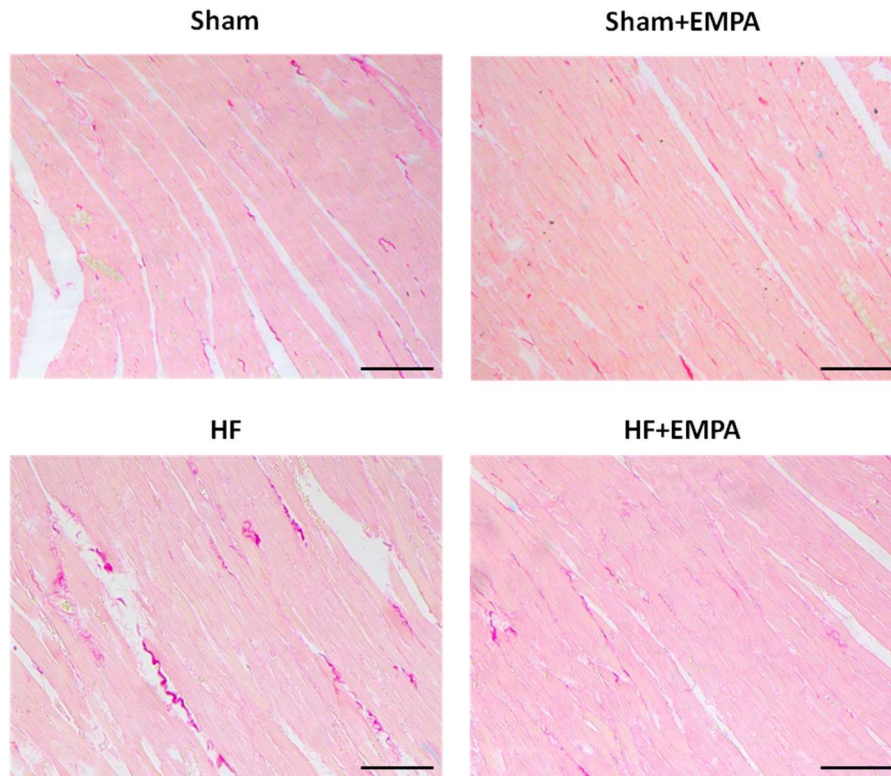
Valores expressos como média ± EPM e significância estatística conforme representação: *p < 0,05, **p < 0,01, e ***p < 0,001 vs. Sham; ###p < 0,001 vs. HF; †p < 0,05, ††p < 0,01, e †††p < 0,001 vs. Sham Empa.

4.2. A empagliflozina atenua o aumento no volume nuclear dos cardiomiócitos e reduz o teor de colágeno intersticial e a expressão de (α-SMA) no tecido cardíaco remanescente

Como documentado na tabela 2, não foi identificada diferença na evolução da hipertrofia do VE entre os grupos HF e HF Empa. No entanto, na análise histológica diferencial, a terapia com empagliflozina foi capaz de diminuir a fibrose intersticial (3,36 ± 0,44 vs 1,75 ± 0,26; p < 0,01) (Fig. 12A-B) e reduzir a proporção de α-SMA no tecido cardíaco remanescente ao infarto (0,2236 ± 0,03 vs 0,06 ± 0,02; p < 0,001) (Fig 13A-B). Além disto, na análise do volume nuclear dos cardiomiócitos, os ratos HF Empa também apresentaram redução da hipertrofia miocitária em comparação ao grupo HF (165,45 ±

22 vs $73,6 \pm 5\mu\text{m}^2$; $p < 0,001$) (Fig 14A-B). Em conjunto com a diminuição da hipertrofia do VD e menor curva de BNP sérico, estes achados documentam a cardioproteção estrutural induzida por empagliflozina no modelo de IC não diabética.

A



B

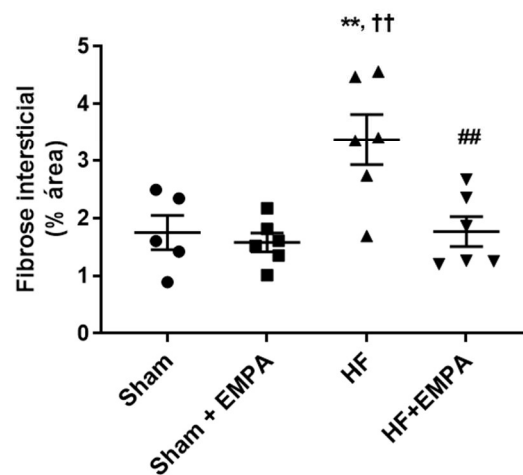
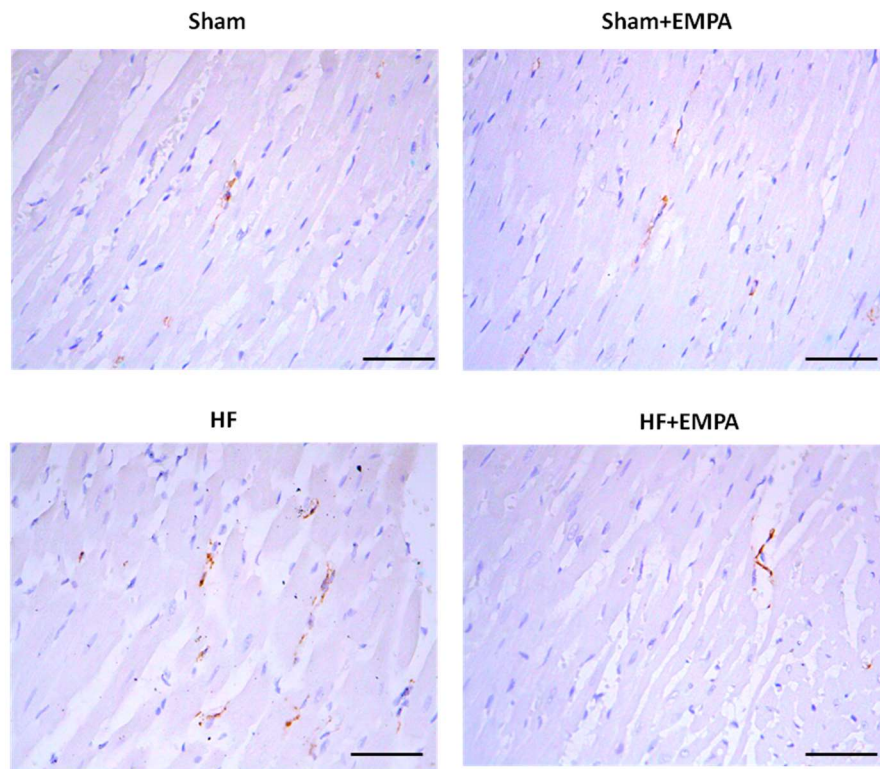


Figura 12. Avaliação da fibrose intersticial do miocárdio remanescente ao infarto. (A) Representação histológica e (B) Quantificação da área de fibrose intersticial. Os valores representam as médias \pm EPM, ** $p < 0,01$ vs. Sham; ## $p < 0,01$ vs. HF; †† $p < 0,01$ vs. Sham Empa.

A



B

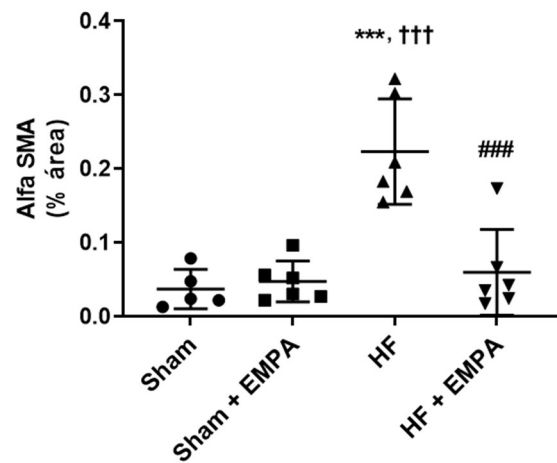
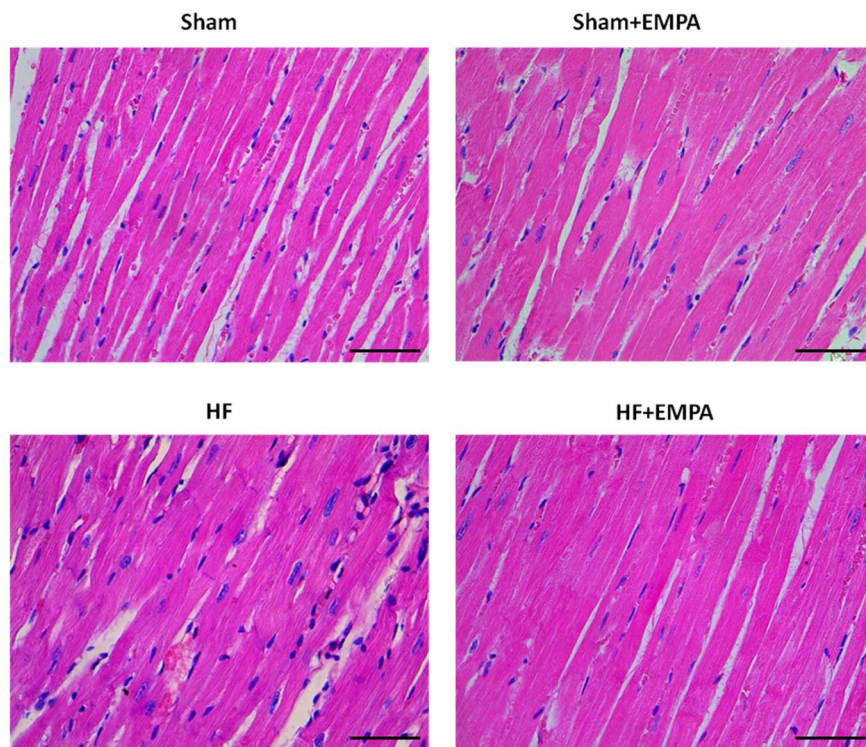


Figura 13. Análise imunohistoquímica de alfa-SMA no tecido cardíaco remanescente. (A) Representação histológica e (B) Quantificação da área de alfa SMA marcada. Os valores representam as médias \pm EPM. *** $p < 0,001$ vs. Sham; ### $p < 0,001$ vs. HF; ††† $p < 0,001$ vs. Sham + EMPA.

A



B

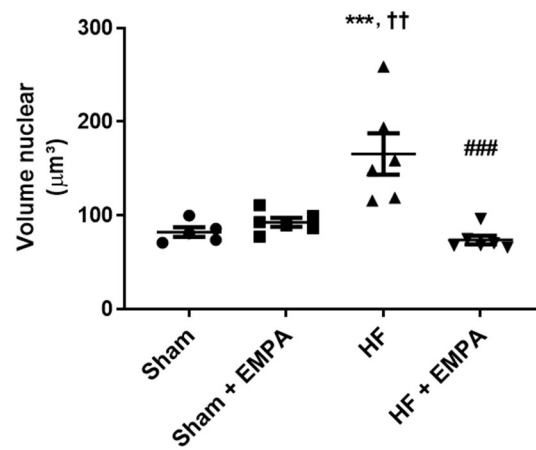
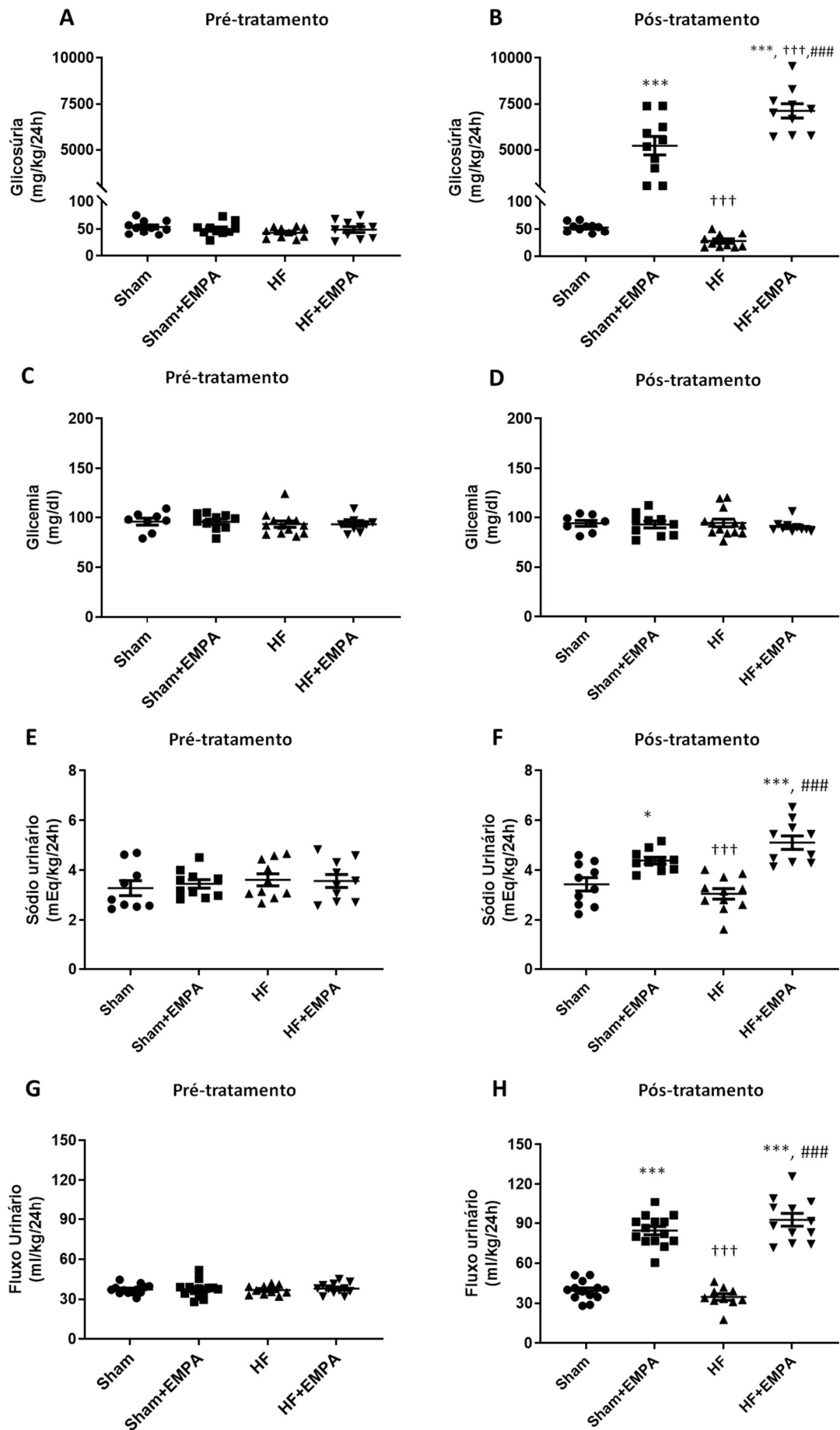


Figura 14. Avaliação volume nuclear dos cardiomiócitos. ((A) Representação histológica e (B) Quantificação do volume nuclear miocitário. Os valores representam as médias \pm EPM. *** $p < 0,001$ vs. Sham; ### $p < 0,001$ vs. HF; †† $p < 0,01$ vs. Sham Empa.

4.3. A empagliflozina induz maiores valores de glicosúria, diurese e natriurese em ratos HF do que em ratos Sham

Como esperado, a glicosúria apresentou valores similares nos quatro grupos na fase pré-tratamento (Figura 15A), mas, observou-se o seu acentuado aumento nos grupos Sham e HF tratados com Empa em comparação aos animais não tratados (Figura 15B). Curiosamente, o efeito glicosúrico da empagliflozina foi ainda mais pronunciado nos ratos HF do que nos ratos Sham (7118 ± 387 vs 5231 ± 500 mg/kg/24h; $p < 0,001$) (Figura 15B). Vale ressaltar também que as alterações na excreção urinária de glicose entre os quatro grupos não provocaram modificações significativas na glicemia dos animais (Figura 15C-D). Semelhante aos achados da excreção urinária de glicose, não foram encontradas diferenças na excreção urinária de sódio (Figura 15E) e no fluxo urinário (Figura 15G) dos quatro grupos no pré-tratamento. Por outro lado, na fase pós-tratamento, o sódio urinário (Figura 15F) e o fluxo urinário (Figura 15H) foram significativamente maiores no grupo Sham Empa e HF Empa do que nos grupos não tratados. Mais especificamente, os animais HF Empa apresentaram sódio urinário ainda maiores do que os valores observados no grupo ratos Sham Empa (Figura 15F). Adicionalmente, ratos Sham Empa e HF Empa apresentaram também maior ingestão de água e sódio quando comparados seus pares não tratados (Figura 15 I-L).



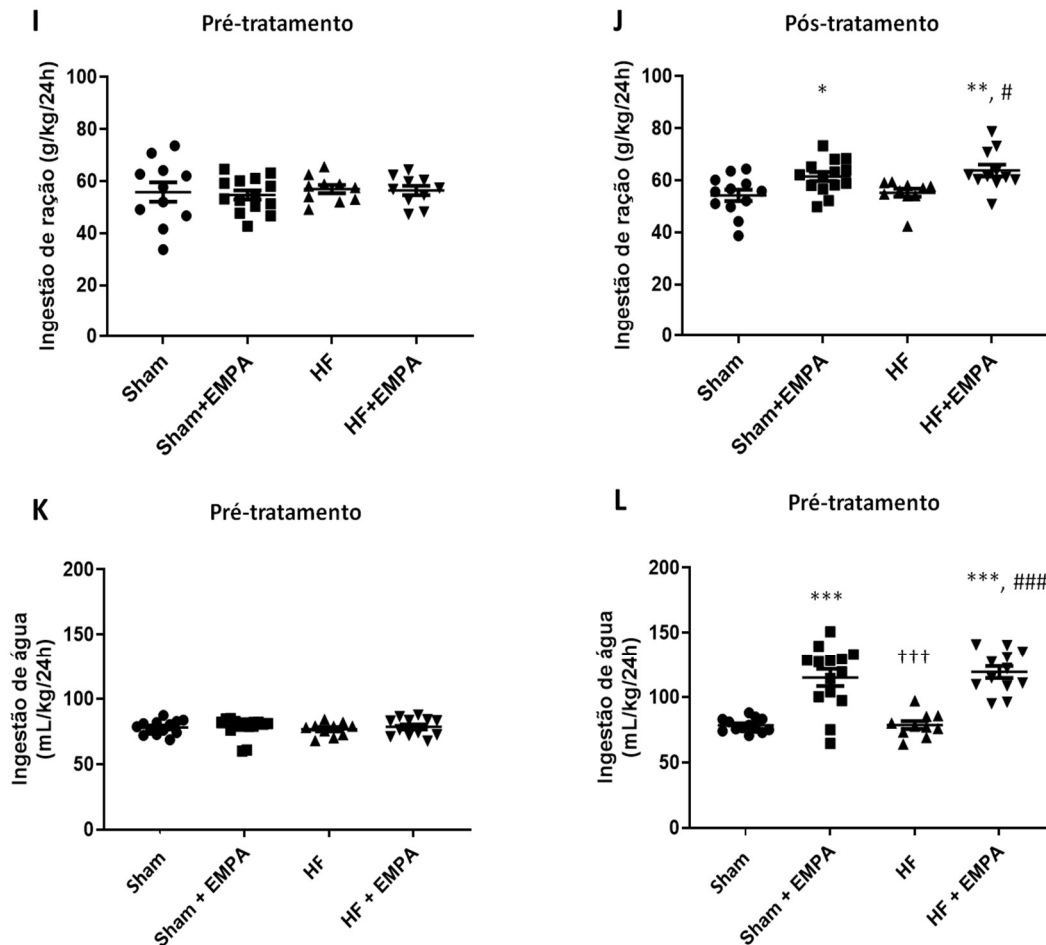
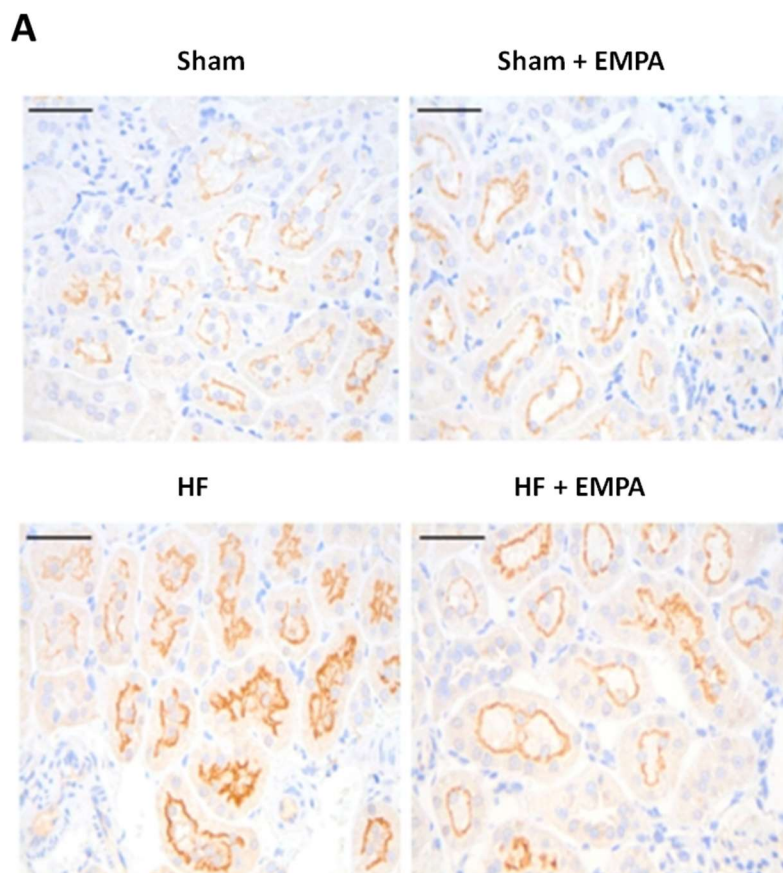


Figure 15. Tratamento com empagliflozina induz maior glicosúria, fluxo urinário e excreção de sódio em ratos com insuficiência cardíaca (IC) do que em ratos Sham. Os ratos foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas para coleta de urina de 24 horas para medir glicosúria, fluxo urinário, sódio urinário, ingestão de ração e água. O sangue foi coletado de ratos em jejum de 12 horas para a determinação de (A-B) glicosúria, (C-D) glicemia, (E-F) sódio urinário, (G-H) fluxo urinário, (I-J) ingestão de ração e (K-L) ingestão de água. Os experimentos foram conduzidos 4 semanas após o infarto do miocárdio ou cirurgia fictícia (pré-tratamento) e 4 semanas após o tratamento com Empa ou veículo (pós-tratamento). Os valores representam as médias \pm EPM. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs. HF; +++ $p < 0,001$ vs. Sham Empa.

4.4. O cotransportador de SGLT2 é hiperexpresso no túbulo proximal de ratos HF não diabéticos

Uma vez que a glicosúria induzida por Empa nos ratos com IC foi significativamente maior do que aquela observada nos animais Sham tratados com Empa, avaliou-se a expressão diferencial de SGLT2 neste modelo experimental de IC. A expressão proteica de SGLT2 no TP dos quatro grupos de ratos foi inicialmente avaliada por imunohistoquímica, com cortes dos túbulos proximais corados e apresentados por fotomicrografias (Figura 16A). Os resultados desta análise qualitativa sugeriram

fortemente a hiperexpressão de SGLT2 no TP de ratos HF em comparação com os grupos Sham Empa e HF Empa (Figura 16A). O passo seguinte foi avaliar a expressão proteica de SGLT2 no córtex renal pela técnica de imunoblotting. Documentou-se através desta, o aumento da abundância relativa da proteína no córtex de ratos HF em comparação aos ratos Sham e Sham Empa (Figura 16B-C). Como evidenciado na figura 13D, além da maior expressão proteica, identificamos também maiores níveis da expressão de RNAm de SGLT2 no córtex renal dos ratos HF em comparação aos animais Sham (Figura 16D). Em contrapartida ao observado nos ratos HF, o tratamento com empagliflozina reduziu não somente a abundância proteica mas também a hiperexpressão gênica de SGLT2 nos ratos HF Empa. (Figura 16B-D). Todavia, a expressão de SGLT2 (proteína e RNAm) permaneceu significativamente superior nos ratos HF Empa em relação aos animais Sham tratados ou não com a gliflozina (Figura 16B-D).



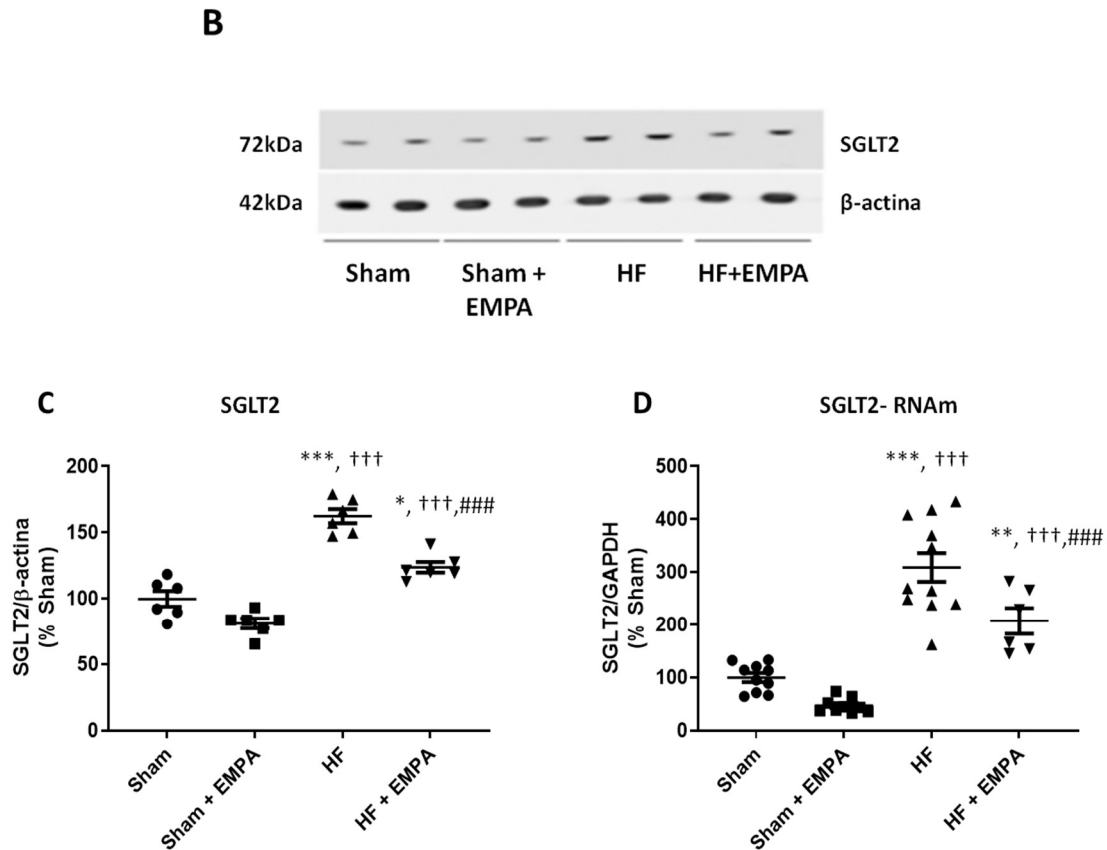


Figure 16. O cotransportador de sódio-glicose do tipo 2 (SGLT2) está hiperexpresso no túbulo proximal de ratos não diabéticos com IC. (A) Coloração imuno-histoquímica representativa de SGLT2 no TP de ratos Sham e HF tratados ou não com Empa; na escala de 50 μ m. (B) Imunotransferências representativas de SDS-PAGE de proteínas corticais renais isoladas de ratos Sham e HF tratados com Empa ou não tratados e sondados com anticorpos contra SGLT2 e β -actina. (C) Representação gráfica dos níveis relativos de abundância da proteína SGLT2 no córtex renal dos quatro grupos (D) Representação gráfica da expressão relativa de RNAm de SGLT2 no córtex renal de ratos Sham e HF tratados com Empa ou não. Os níveis de RNAm de SGLT2 foram medidos usando PCR quantitativo, e o GAPDH foi utilizado como controle interno. Os valores representam as médias \pm EPM * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ vs. Sham; #### $p < 0,01$ e ##### $p < 0,001$ vs. HF; ††† $p < 0,001$ vs Sham Empa.

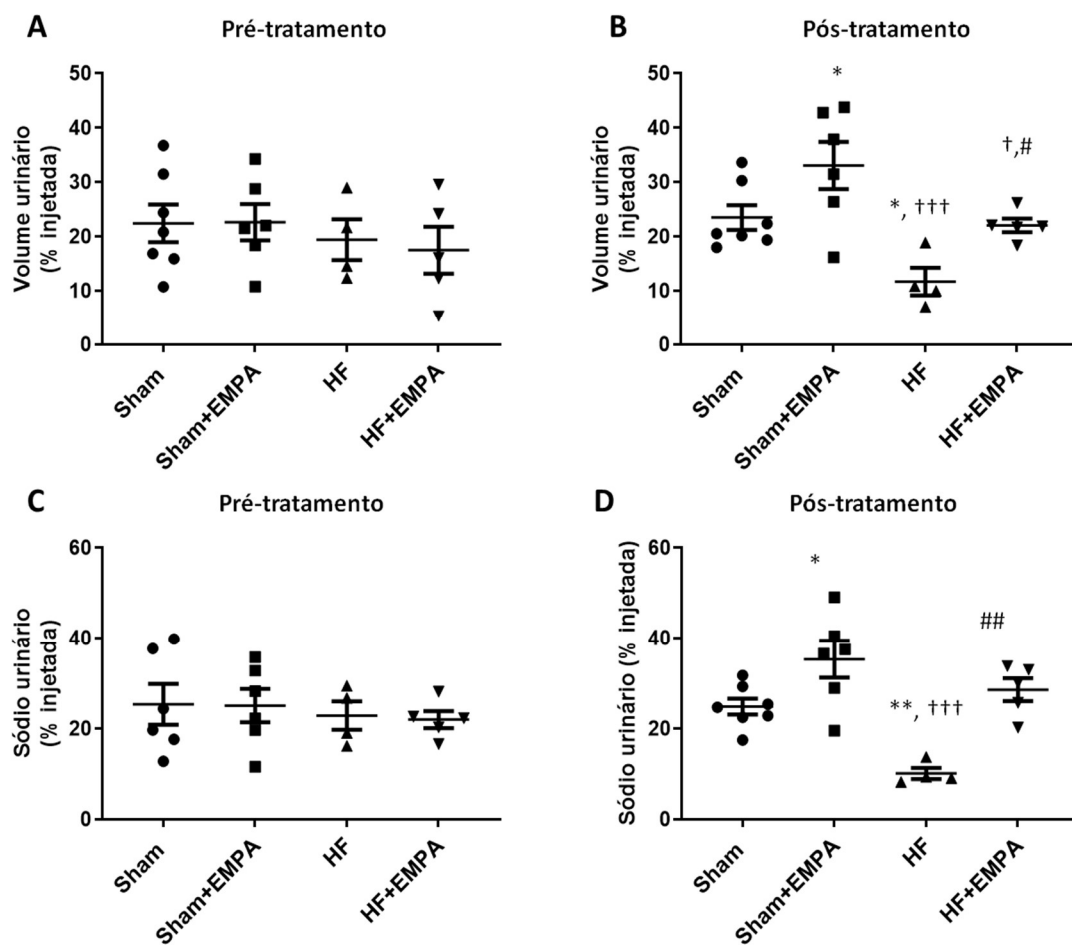
4.5. A Empagliflozina restaura a euvolemia em ratos HF não diabéticos

Para avaliar a resposta volêmica e o manejo hidrossalino, testamos inicialmente a capacidade renal aguda de lidar com sal e água nos quatro grupos, tanto na fase pré como no pós-tratamento (Figura 17). A porcentagem da carga de sódio excretada e o volume urinário dentro de 3 horas após a sobrecarga salina foi similar entre os quatro grupos no pré-tratamento (Figura 17A e C). No entanto, na fase pós tratamento, os ratos HF apresentaram menor volume urinário (Figura 17B) e menor carga de sódio excretada (Figura 17D) do que ratos Sham e ratos HF Empa. Ademais, observamos também

porcentagens similares de volume urinário e carga de sódio urinária em ratos Sham e ratos HF Empa (Figura 17B e D).

Em seguida, avaliamos as alterações no hematócrito como desfecho secundário da resposta volêmica. Na fase pré-tratamento, foram encontrados valores similares nos quatro grupos (Figura 17E). Enquanto, no pós-tratamento, os ratos HF mantiveram valores de hematócrito inferiores ao dos ratos Sham (Figura 17F). Além disso, o tratamento com empagliflozina restaurou o hematócrito de ratos HF para níveis semelhantes aos dos grupos Sham (Figura 17F).

Somado à análise de restauração da euvolemia, avaliamos também o efeito pressórico da empagliflozina. Ratos HF e HF Empa exibiram menor pressão arterial na pletismografia de cauda do que os dois grupos Sham, tanto na fase pré como no pós-tratamento (Figura 17G-H). No entanto, o tratamento com empagliflozina não afetou a pressão arterial em nenhum dos grupos tratados, Sham ou HF (Figura 17H).



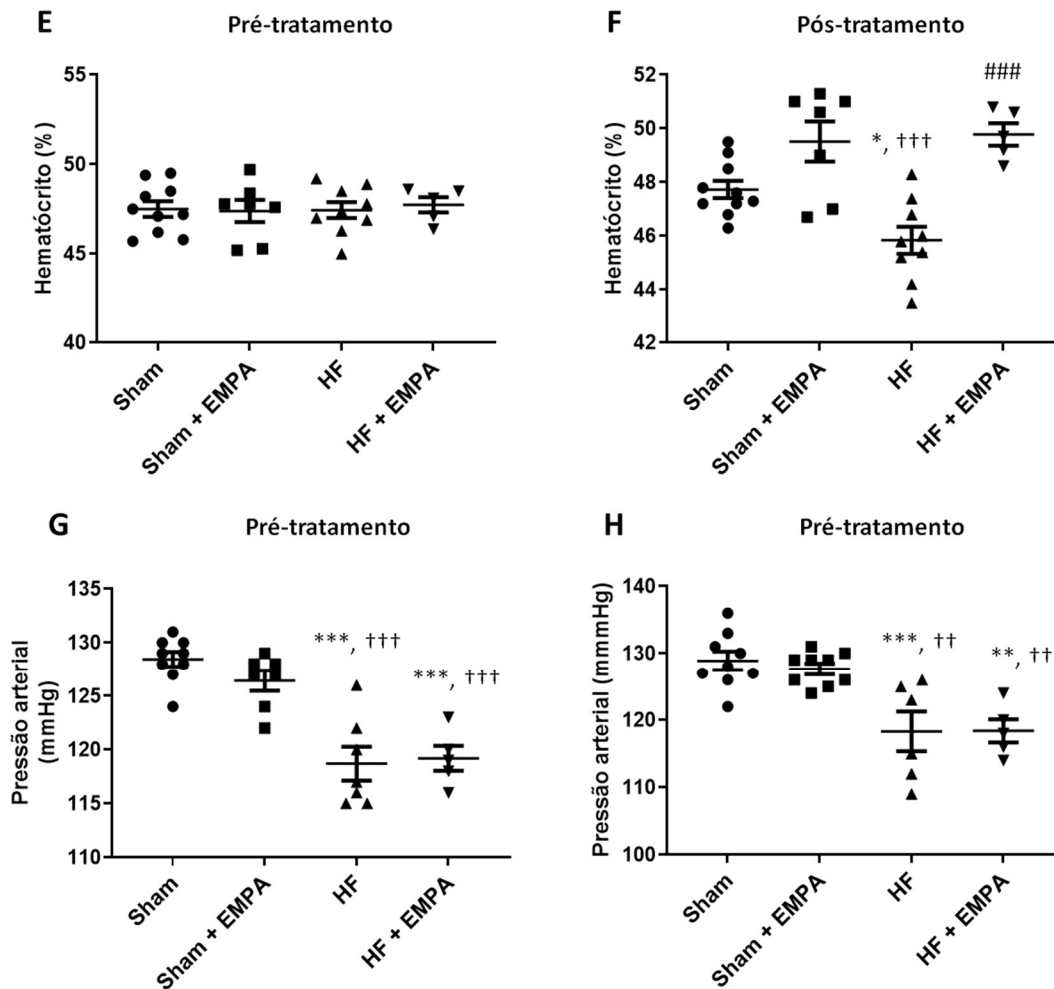


Figura 17. O tratamento com empagliflozina melhora o estado volêmico em ratos não diabéticos com insuficiência cardíaca. (A-D) Os ratos receberam administração intraperitoneal de solução salina equivalente a 10% do seu peso corporal e foram então colocados em gaiolas metabólicas para coleta de urina de 3 horas. (A-B) Porcentagens da carga de fluido excretada dentro de 3 horas após o desafio salino. (C-D) Porcentagens da carga de sódio excretada dentro de 3 horas após o desafio salino. (E-F) Evolução do hematócrito. (G-H) Pressão arterial medida através da pletismografia de cauda. Os experimentos foram conduzidos quatro semanas após o infarto do miocárdio ou cirurgia fictícia (pré-tratamento) e quatro semanas após o tratamento com Empa ou nenhum tratamento (pós-tratamento). Os valores representam medições individuais e as médias \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. Sham; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs. HF; † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$ e ††† $p < 0,001$ vs. Sham Empa.

4.6. A empagliflozina previne a redução da TFG, atenua a proteinúria e preserva a massa renal em ratos HF não diabéticos

Conforme ilustrado na Figura 15, os parâmetros da função renal foram avaliados durante os períodos pré-tratamento e pós-tratamento. Na primeira fase, não foram observadas diferenças na TFG (Figura 18A) ou na excreção de proteína urinária entre os

quatro grupos (Figura 18E), exceto nos níveis mais elevados de ureia sérica em ratos HF do que nos grupos Sham (Figura 18C). No entanto, após o tratamento, ratos HF apresentaram menor TFG (Figura 18B), níveis superiores de ureia sérica (Figura 18D) e maior proteinúria (Figura 18F) do que os outros três grupos. Ademais, observou-se também no grupo HF a piora nos três parâmetros de análise da função renal desde o pré-tratamento à fase pós (Figura 18A-F). Em contrapartida, ratos HF Empa exibiram valores de TFG, ureia sérica e proteinúria próximos aos dos grupos Sham. Correlacionando os dados biométricos com estes funcionais, os ratos HF exibiram menor peso renal normalizado pelo comprimento da tíbia do que os grupos Sham, enquanto o tratamento com empagliflozina foi capaz de prevenir esta atrofia renal (Tabela 2). O menor peso renal observado nos ratos HF associa-se também com a maior porcentagem de células renais apoptóticas positivas na marcação TUNEL e maior expressão de caspase-3 clivada (Figura 19). Curiosamente, ambos os indicadores de apoptose renal também foram normalizados pela terapia com Empa.

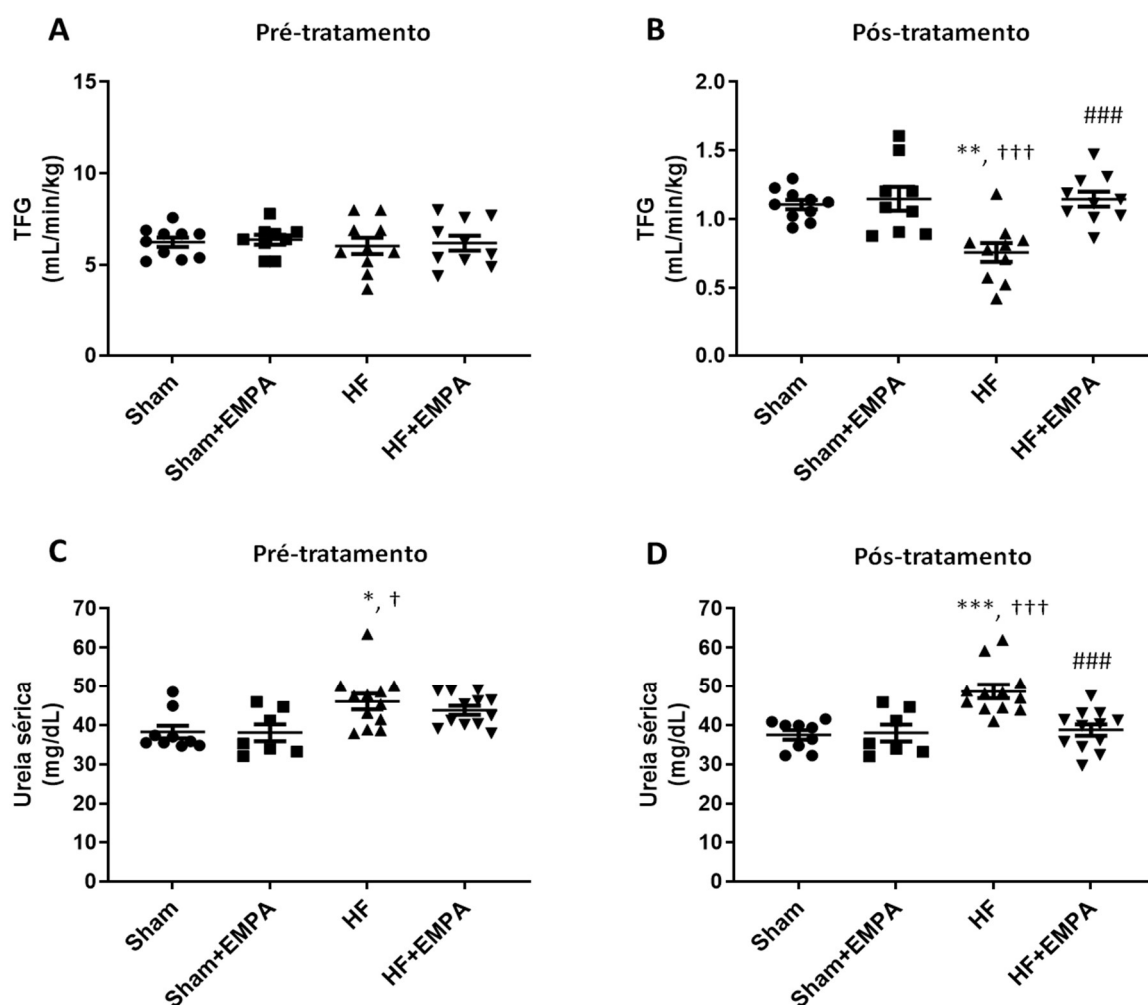


Figura 18. O tratamento com empagliflozina previne a redução da taxa de filtração glomerular e atenua a proteinúria em ratos com insuficiência cardíaca. Os ratos foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas para coleta de urina de 24 horas para medir TFG e proteinúria, e sangue coletado para dosagem de ureia e creatinina séricas. (A-B) A TFG foi estimada pelo clearance de creatinina. (C-D) A uréia sérica foi medida por colorimetria. (E-F) Representação gráfica da relação proteína/creatinina na urina, também medida por colorimetria. Os experimentos foram conduzidos 4 semanas após o infarto do miocárdio para indução de HF ou cirurgia fictícia (pré-tratamento) e 4 semanas após o tratamento com EMPA ou nenhum tratamento (pós-tratamento). Os valores representam as médias \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. Sham; ## $p < 0,01$ e #### $p < 0,001$ vs. HF; † $p < 0,05$ e ††† $p < 0,001$ vs. Sham Empa.

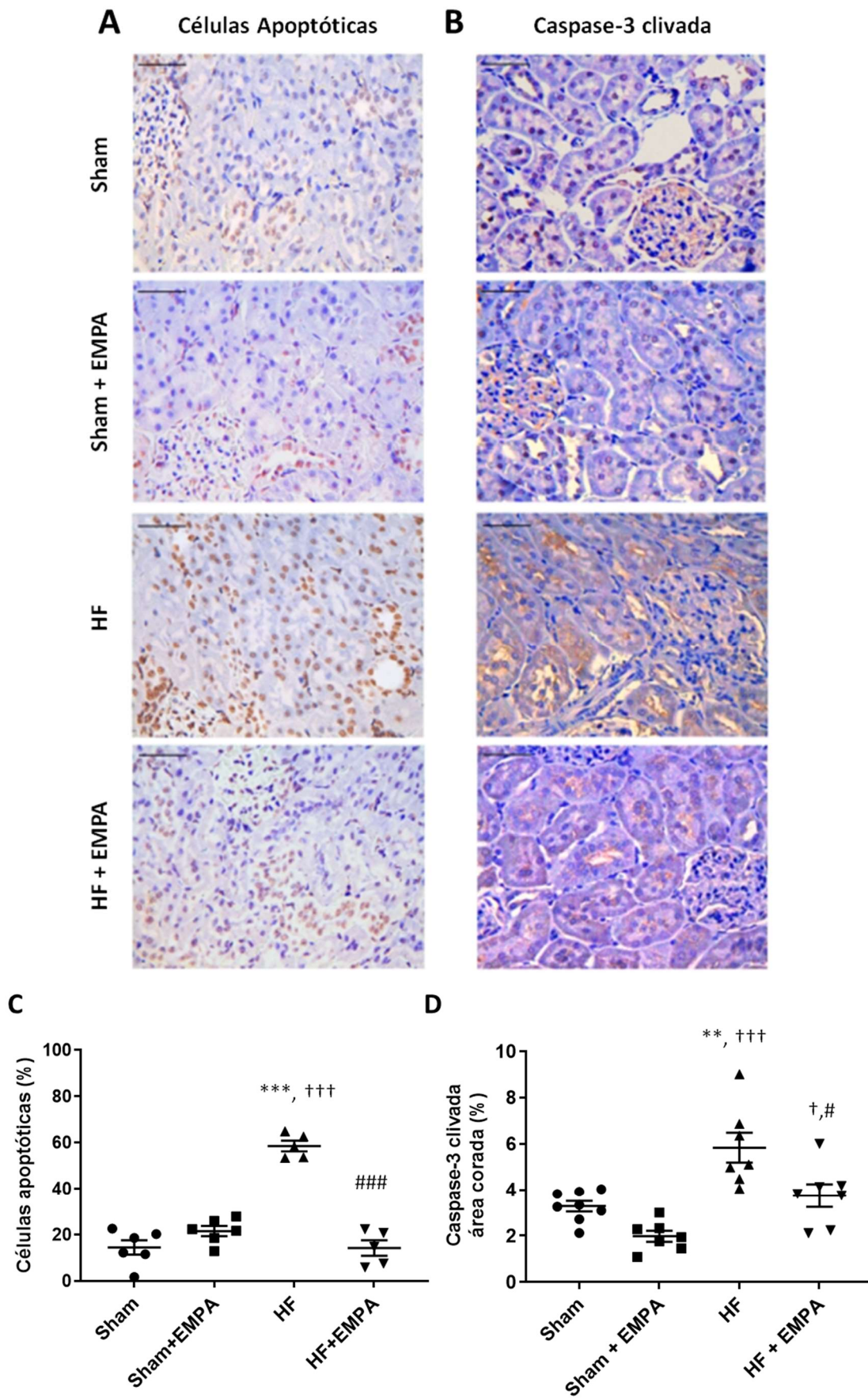
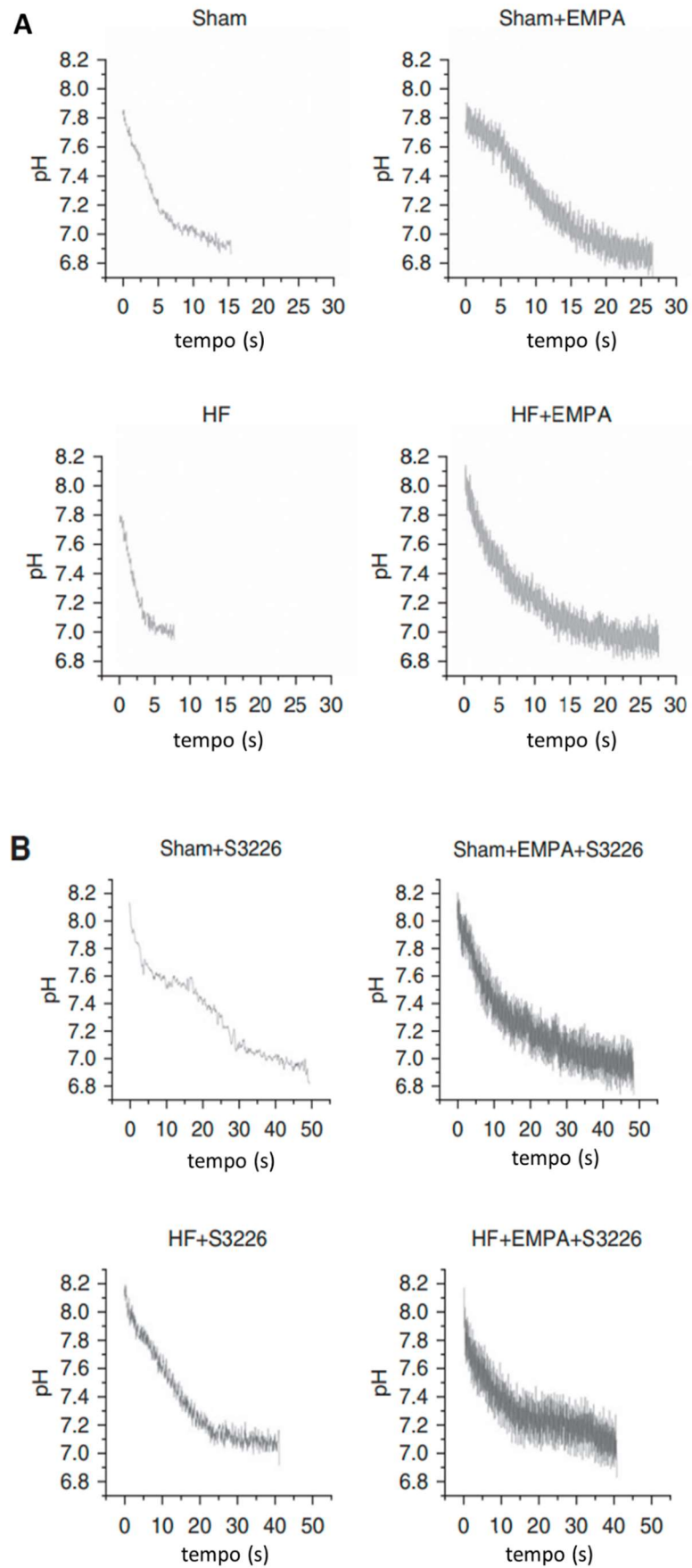


Figura 19. Tratamento com empagliflozina normaliza a apoptose renal e abundância de

caspase-3 clivada em ratos com insuficiência cardíaca. (A-B) Fotomicrografias representativas de seções renais (ampliação de 400x) de ratos HF e Sham tratados com EMPA ou não, na escala de 50 μm . (A) A marcação por TUNEL foi empregada para detectar células apoptóticas com extensa degradação de DNA. (B) Coloração imunohistoquímica de caspase 3 clivada. (C) A quantificação de núcleos apoptóticos e (D) áreas positivas para caspase-3 clivada foram determinadas em cinco campos aleatórios por lâmina utilizando o software Image J. Estas análises foram realizadas por dois investigadores cegos para os grupos experimentais. Os valores representam as médias \pm EPM. **p < 0,01 e ***p < 0,001 vs. Sham; #p < 0,05 e ###p < 0,001 vs. HF; †p < 0,05 e †††p < 0,001 vs. Sham Empa.

4.7. A empagliflozina inibe a atividade de NHE3 no túbulo proximal

Para avaliar a modulação da atividade do NHE3 pela empagliflozina, foi registrado o pH luminal do túbulo proximal através da microperfusão estacionária *in vivo*, na presença e na ausência do inibidor S3226 específico de NHE3. Os registros da recuperação do pH para cada grupo experimental estão apresentados na Figura 20 A-B. Como demonstrado em sequência (Fig 20C), a taxa acidificação luminal do TP ($D[\text{H}^+]/\text{Dt}$) foi mais pronunciada nos ratos HF do que em ratos Sham e o tratamento com empagliflozina reduziu fortemente a acidificação luminal no TP tanto de ratos HF como ratos Sham (Figura 20C). Entretanto, o efeito inibitório da Empa na acidificação tubular foi ainda mais pronunciado nos ratos HF (aproximadamente 70% de inibição vs. ratos HF não tratados) em comparação ao grupo Sham tratado (aproximadamente 45% de inibição vs. Sham não tratados). Ademais, quando os túbulos proximais dos quatro grupos foram perfundidos com o inibidor S3226 seletivo de NHE3, não foram observadas diferenças na acidificação tubular; confirmando que as diferenças na secreção de H^+ foram induzidas por Empa via modulação da atividade de NHE3 (Figura 20D).



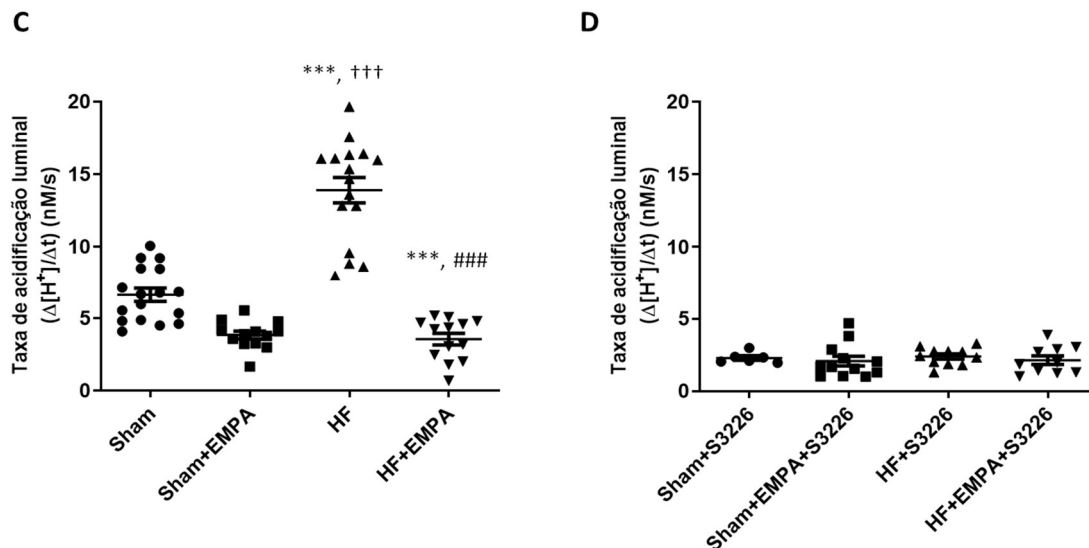
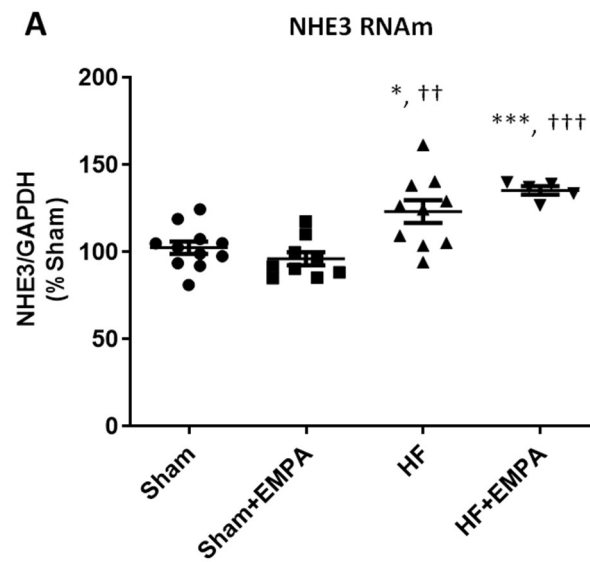


Figure 20. Tratamento com empagliflozina inibe a atividade de NHE3 no TP. (A–D) A inibição da atividade do NHE3 por Empa foi determinada pela avaliação da acidificação luminal do TP na presença ou ausência de 10 mM de S3226, um inibidor seletivo do NHE3. (A e C) Registros de pH luminal representativos e a taxa de acidificação luminal em ratos Sham e HF tratados ou não, na ausência de S3226. (B e D) Registros de pH luminal representativos e a taxa de acidificação luminal na presença de S3226. Os valores representam as médias \pm EPM. * $p=0,02$ vs. Sham; ** $p=0,002$ vs. Sham; *** $p<0,001$ vs. Sham; † $p=0,02$ vs. Sham EMPA; †† $p=0,001$ vs. Sham EMPA; ††† $p<0,001$ vs. Sham EMPA; # $p=0,03$ vs. HF; ### $p<0,001$ vs. HF.

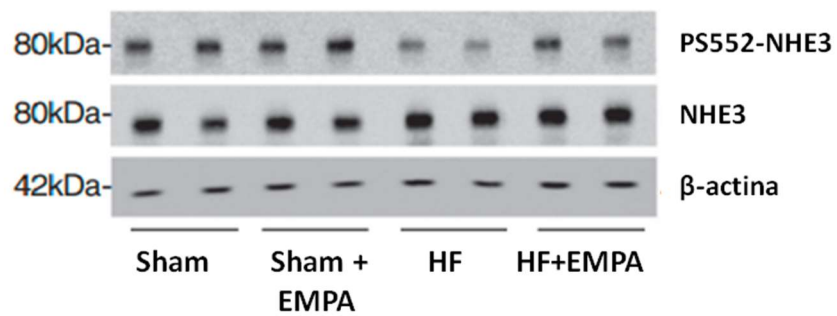
Junto à demonstração da maior atividade de NHE3 na microperfusão estacionária no TP renal, observamos também a elevação dos níveis de RNAm de NHE3 (Figura 21A) e a maior expressão proteica de NHE3 no TP de ratos HF (Figura 21, B e C). Por sinal, embora a terapia com empagliflozina tenha reduzido a atividade de NHE3, o inibidor de SGLT2 não afetou a expressão gênica ou proteica de NHE3 no córtex renal de ratos HF ou Sham (Figura 21, A–C).

A fosforilação de NHE3 na serina 552 (PS552-NHE3) já é bem descrita na literatura como desfecho substituto representativo da inibição de NHE3 no TP renal (34, 72,73). Juntamente com a maior atividade de NHE3 no TP, ratos HF apresentaram também menores níveis na razão PS552-NHE3/NHE3 total do que os outros três grupos de animais (Figura 21, B e D). Por sua vez, os animais HF Empa apresentaram maiores valores de PS552-NHE3/NHE3 total do que ratos HF, estando ambos os grupos com relações menores do que aquelas observadas nos grupos Sham e Sham Empa. Importante mencionar também que embora a empagliflozina tenha inibido a atividade

de NHE3 no TP de ratos Sham, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de PS552- NHE3 / NHE3 total entre os grupos Sham (Figura 21, B e D).



B



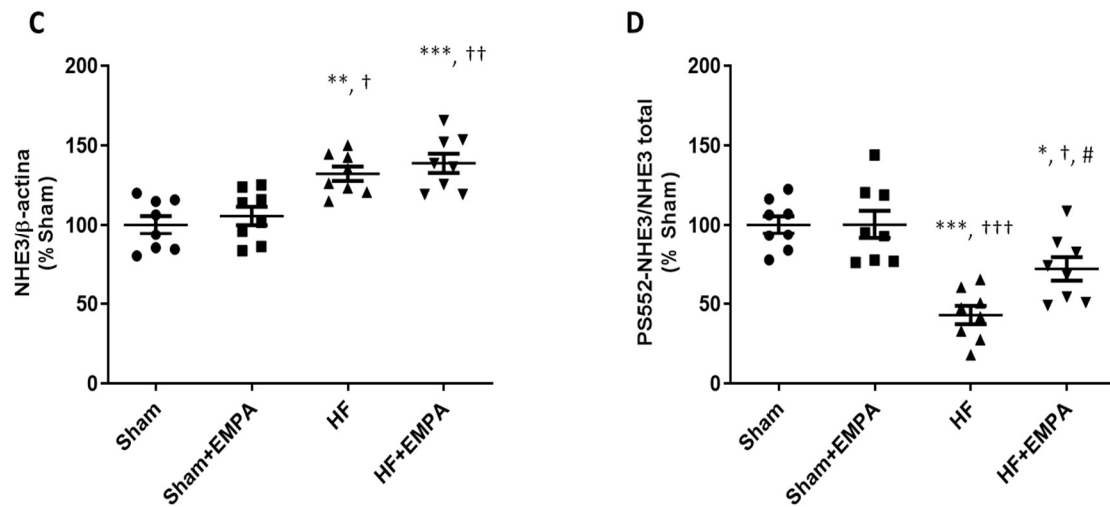


Figure 21. Tratamento com empagliflozina aumenta a fosforilação de NHE3 na serina 552. (A) Representação gráfica da expressão relativa de RNAm de NHE3 no córtex renal de ratos Sham e HF tratados ou não com Empa. Os níveis de RNAm de NHE3 foram medidos usando PCR quantitativo, e GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) utilizado como controle interno. (B) As proteínas corticais renais isoladas dos quatro grupos foram resolvidas por SDS-PAGE e transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno. As membranas foram marcadas com um anticorpo primário contra NHE3 total, anticorpo fosfoespecífico que reconhece NHE3 somente quando é fosforilado na serina 552 (PS552-NHE3) e um anticorpo contra β-actina como controle interno. (C) Representação gráfica da expressão relativa de NHE3 total e (D) proporção de NHE3 fosforilado na serina 552 para NHE3 total (PS552-NHE3/NHE3 total). Os valores representam as médias ± EPM. *p=0,02 vs. Sham; **p=0,002 vs. Sham; ***p<0,001 vs. Sham; † p=0,02 vs. Sham EMPA; ††p=0,001 vs. Sham Empa; †††p<0,001 vs. Sham Empa; # P= 0,03 vs. HF; ####p<0,001 vs. HF.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho fornece evidências de que o inibidor de SGLT2 empagliflozina confere benefícios renais sustentados, capazes de atenuar a progressão da IC não relacionada ao DM2. Nossos resultados demonstram que a empagliflozina preserva a função glomerular, previne a apoptose renal induzida pela IC e a perda de massa renal, além de gerar substancial redução da reabsorção de sódio mediada por NHE3 no TP. Estes efeitos foram acompanhados da restauração da euvolemia, da diminuição dos níveis circulantes de BNP, da prevenção da congestão pulmonar e da redução da hipertrofia do VD. Apesar de não identificado diferença no peso do VE normalizado pelo comprimento da tíbia em ratos com IC, documentamos aqui a redução da hipertrofia miocitária e da fibrose intersticial cardíaca induzidas por Empa. Além disso, este estudo foi o primeiro a documentar a hiperexpressão de SGLT2 no TP renal de ratos com IC não diabéticos. Curiosamente, a empagliflozina não somente suprimiu a reabsorção de glicose mediada por SGLT2, mas também reduziu a hiperexpressão proteica e gênica de SGLT2 no córtex renal dos ratos com IC.

A avidéz renal por sódio e a sobrecarga volêmica são características marcantes da IC e estão frequentemente associadas ao pior prognóstico e progressão da doença (21). A retenção de sódio e água presentes na IC ocasionam maior edema pulmonar, aumento da pressão arterial pulmonar e contribuem, fortemente, à hipertrofia do VD e posterior disfunção de câmaras direitas (74). Neste trabalho, documentamos que os animais portadores de IC apresentaram menor resposta natriurética e diurética à sobrecarga salina, menor hematócrito e níveis mais elevados de BNP, assim como maior congestão pulmonar e hipertrofia do VD. Em oposição a esta evolução, o tratamento com empagliflozina foi capaz de restaurar a euvolemia, com melhor manuseio renal de sódio e água e normalizar o hematócrito e os níveis séricos de BNP. Diferentes estudos apontam para um efeito diurético diferencial das gliflozinas, como o potencial já demonstrado de gerar redução persistente de 7% no volume plasmático em pacientes DM2. (75,76). Análises do estudo DAPA-HF também indicam que o tratamento com dapagliflozina aumenta a depuração de água livre de eletrólitos em comparação com diuréticos de alça (77). Nesta linha, análises matemáticas de modelagem cardiorrenal

sugerem que o efeito diurético específico dos inibidores de SGLT2 levaria a maiores reduções no fluido intersticial em relação ao volume plasmático; no entanto, aferições experimentais diretas ainda são necessárias para fortalecer esta hipótese (78). Em nosso trabalho, a redução sustentada da sobrecarga volêmica por Empa preveniu a congestão pulmonar e a hipertrofia do VD. Em consonância com estes achados, Chowdhury e colaboradores (79) evidenciaram que o tratamento com Empa em ratos com hipertensão pulmonar grave também foi capaz de reduzir a pressão média da artéria pulmonar, a pressão sistólica do VD e a hipertrofia do VD. Adicionalmente, o ensaio clínico EMBRACE-HF também documentou a indução de menores valores de pressão da artéria pulmonar por Empa já na primeira semana de tratamento, além da amplificação deste efeito ao longo do tempo, e independente do manejo com diuréticos de alça(80). Esta associação de evidências reforça a hipótese de que a redução da sobrecarga de volume pelos inibidores de SGLT2 seria um dos mecanismos subjacentes à precoce e sustentada diminuição da taxa de hospitalização por IC descompensada.

Apesar de não termos encontrado diferenças significativas na hipertrofia do VE, estudos clínicos e experimentais (81-84) apontam para a redução da massa de VE induzida pelo uso de iSGLT2, assim como para melhora da função diastólica, observada em estudos de hemodinâmica com ratos hipertensos DOCA/sal e ICFEP. Talvez pelo alto impacto na massa do VE induzido pelo nosso modelo de IAM e ICFER induzida, com função sistólica muito prejudicada (FAC média grupos HF e HF Empa pré-tratamento de 21,4%) e por limitações próprias do método ecocardiográfico, não encontramos diferenças na análise macroestrutural e funcional diastólica do VE. Em contrapartida, na análise do tecido cardíaco do VE remoto à área de infarto, identificamos a atenuação da hipertrofia miocitária, menor fibrose intersticial e menor proporção de alfa-SMA. Em linha com este resultado, experimentos não publicados do nosso grupo com cardiomiócitos isolados de ratos neonatais expostos a endotelina-1 acrescentam que, quando tratados com Empa, (1 μ M), as células cardíacas apresentam menor volume nuclear, menor secreção de colágeno tipo 1, além de observar a maior proliferação de células endoteliais coronárias. Em conjunto, estima-se que além dos benefícios renais e hemodinâmicos para cardioproteção secundária, ações “off-target” dos iSGLT2,

diretamente nos cardiomiócitos, também contribuem para reduzir o remodelamento ventricular na IC.

As principais causas da retenção de sal e água pelos rins na IC são a diminuição da TFG, o aumento da reabsorção tubular de sódio ou mesmo a associação destes. Neste estudo, demonstramos que a Empa previne de forma sustentada a diminuição da TFG em ratos com IC não diabéticos. O que, inicialmente, pode parecer contraditório, pois a nível tubuloglomerular, a partir da inibição de SGLT2 ocorre o aumento da oferta de sódio e cloreto para a mácula densa, contendo os estímulos arteriolares de aumento da pressão intra-glomerular, restaurando o feedback tubuloglomerular e levando a redução inicial da TFG. No entanto, esta pequena diminuição inicial também foi observada no estudo DAPA-HF e associada à taxa mais lenta de declínio da TFG, sem correlacionar com a maior incidência de eventos adversos renais (85). Em nosso estudo, a preservação da TFG em ratos HF tratados com Empa pode ser explicada, ao menos em parte, pela constatação de que a empagliflozina pode prevenir a atrofia renal induzida pela hipoperfusão na IC, a apoptose renal e a consequente disfunção renal tubuloglomerular. A preservação da função glomerular pode decorrer também da melhora da disfunção ventricular induzida por Empa. De forma modesta, mas significativa, documentamos aqui o aumento da função sistólica cardíaca nos ratos com IC tratados com iSGLT2. Vale nesse sentido também contextualizar que para a realização da ecocardiografia neste trabalho, os ratos foram anestesiados com medicamento inalatório de efeito inotrópico negativo residual, o que poderia num comparativo com a ecocardiografia sob estresse farmacológico, por exemplo, limitar o poder de detecção de um benefício cardíaco ainda mais pronunciado.

A redução do fluxo sanguíneo renal secundário à diminuição do débito cardíaco e aumento da congestão venosa constitui-se provavelmente no principal fator desencadeante da redução da TFG e da perda de massa renal na IC. No entanto, ainda carece elucidar se os inibidores de SGLT2 seriam capazes de melhorar a perfusão renal no contexto da disfunção cardíaca não associada ao DM2. Curiosamente, o tratamento com outro inibidor de SGLT2, a luseogliflozina impediu a rarefação endotelial, a hipóxia renal e o desenvolvimento de fibrose renal em camundongos com lesão por isquemia/reperfusão através de via de sinalização do fator de crescimento do endotélio

vascular (VEGF)(86). Nesta mesma linha de raciocínio, Pirklbauer e colaboradores (87) demonstraram que a inibição do SGLT2 é capaz de bloquear a expressão dos principais mediadores de fibrose renal e a progressão da doença renal em duas linhas distintas de células tubulares proximais humanas. Análises histopatológicas recentes do nosso grupo com ratos HF não identificaram achados de evolução de fibrose renal, mas evidenciaram menor grau de congestão renal, atrofia tubular e menor expressão de marcadores de polarização macrofágica M1 e maior expressão M2 após o tratamento com Empa. Adicionalmente aos nossos achados de menor apoptose renal e menor expressão de caspase-3 clivada, estudo prévio com modelo experimental de IC por sobrecarga volêmica induzida por fistula aortocaval também demonstrou a presença de alterações renais como congestão, atrofia glomerular e edema com descamação de células epiteliais tubulares renais. Tais achados foram associados à hiperexpressão da proteína pro-apoptótica Bax, liberação mitocondrial de citocromo C e migração nuclear de caspase-3 ativada (88). Em conjunto, pode-se inferir que os efeitos renoprotetores dos inibidores de SGLT2 na IC não diabética são provavelmente mediados não apenas por melhorias na hemodinâmica renal, mas também por ações protetoras locais a nível celular.

A hiperatividade e a hiperexpressão de NHE3 no TP renal estão descritas em literatura com implicação direta na progressão e desenvolvimento da IC, com subsequente retenção de sódio, sobrecarga e edema (89). Somado a publicações anteriores de nosso grupo (31), documentamos também neste modelo de IC, o aumento da atividade, da expressão proteica e gênica de NHE3, além da diminuição da fosforilação na S552-NHE3 no TP de ratos com IC. Além disso, mostramos pela primeira vez que um inibidor seletivo de SGLT2 suprimiu a hiperfunção de NHE3 no TP. O tratamento com Empa reduziu fortemente a atividade de NHE3 tanto em ratos com IC como nos animais Sham, mas com inibição ainda mais pronunciada nos primeiros. Vale ressaltar que a inibição de NHE3 não afetou a expressão proteica nem gênica nos ratos Sham ou mesmo nos animais portadores de IC. Em contrapartida, observou-se uma pequena, mas significativa elevação nos níveis de PS552-NHE3 nos animais IC tratados com Empa. Como não foi encontrada diferença nos níveis de PS552-NHE3 entre ratos Sham tratados e não tratados, pode-se sugerir que o efeito da empagliflozina na PS552-NHE3 em ratos com IC possa decorrer na verdade da atenuação da resposta neuro-

hormonal na IC. De fato, tanto a ativação do sistema nervoso simpático renal quanto ANG II são conhecidos por ativar NHE3, pelo menos em parte, pela diminuição de PS552-NHE3(90,91). No entanto, o principal mecanismo pelo qual a inibição do SGLT2 diminui a atividade de NHE3 no TP na IC permanece desconhecido.

Uma vez que o cotransportador de SGLT2 e o trocador NHE3 se co-localizam no TP renal, algumas evidências da literatura reforçam a linha de existência de interações proteína-proteína entre estes dois transportadores e as proteínas de membrana MAP17 e PDZK1 nas microvilosidades do TP. Coady e seus colaboradores documentaram que MAP17, expressa em maior proporção no segmento S1 do TP, interage diretamente com SGLT2 e de forma essencial para o seu transporte transmembrana (92). Por sua vez, estudos prévios apontam que a proteína MAP17 interage exclusivamente com PDZK1, sem interação com outras proteínas de ancoragem também expressas na borda em escova do TP, como NHERF e NaPi-Cap2 (93). Sabe-se que o transporte de NHE3 nos microdomínios das células tubulares renais é regulado por pelo menos nove diferentes interações proteicas, sendo a proteína de ancoragem PDZK1 uma destas de associação direta com NHE3 (94). Desta forma, postula-se que os iSGLT2 no contexto da IC atuariam sobre este complexo multiproteico modulando a distribuição de NHE3 ao longo da membrana apical das células tubulares renais e reduzindo assim a reabsorção de sódio e a sobrecarga volêmica, características da IC. (Figura 22)

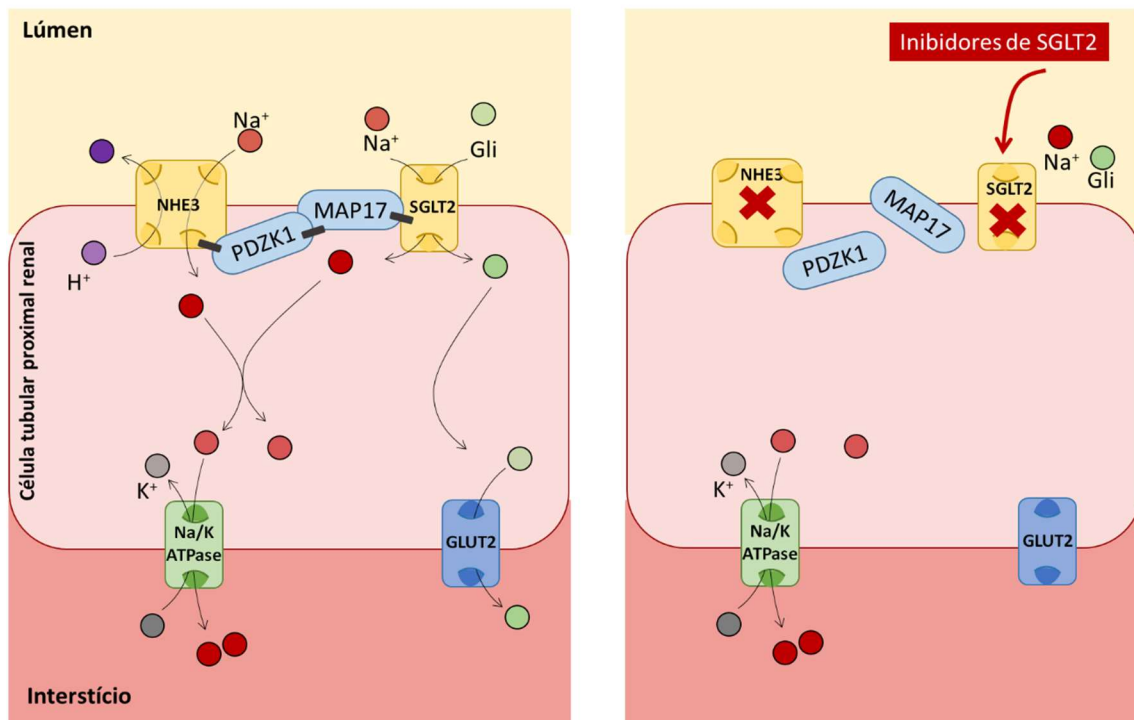


Figura 22. Desenho esquemático ilustrando mecanismo funcional hipotético de interação entre SGLT2 e NHE3 no TP renal e possível rearranjo provocado pelas gliflozinas. A-B) Células tubulares renais expressam SGLT2 e NHE3 na membrana apical e GLUT2 e Na⁺/K⁺-ATPase na membrana basolateral, a reabsorção de glicose ocorre primeiramente através da membrana apical via SGLT2 e depois por saída passiva para o interstício via GLUT2. NHE3 é o principal transportador da reabsorção de sódio, enquanto Na⁺/K⁺-ATPase, responsável por mover o sódio da célula para o interstício. As proteínas de membrana PDZK1 e MAP17 se interagem com NHE3 e SGLT2 formando um complexo proteico funcional que permite a regulação concomitante do volume extracelular junto a homeostase da glicose. B) Sob demanda de experimentação direta para confirmação desta hipótese, sugere-se aqui que os iSGLT2 promovam a ruptura do complexo multiproteico formado por SGLT2-MAP17-PDZK1-NHE3, com consequente inibição substancial da atividade de NHE3.

A função dos cotransportadores de sódio-glicose e dos trocadores de sódio-hidrogênio está intimamente conectada em vários órgãos. As ações de SGLT1 e NHE3 estão ligadas na mucosa intestinal enquanto SGLT2 e NHE3 colocalizam-se no TP renal (31, 95,96) e, estudos recentes mostram que os inibidores de SGLT2 podem reduzir também a atividade do NHE1 em cardiomiócitos. A ativação experimental do NHE1, isoforma expressa no miocárdio, pode promover hipertrofia, morte celular e desenvolvimento de IC, tornando-se um alvo terapêutico interessante para estudo (97). Baartscheer e colaboradores propuseram pela primeira vez que os inibidores de SGLT2

poderiam funcionar como antagonistas de NHE1 no coração e postularam que as gliflozinas poderiam exercer benefícios diretos nos cardiomiócitos, independente da glicosúria renal ou de qualquer interação com SGLT2(98,99). Nesta linha, a incubação de cardiomiócitos de ratos com inibidores de SGLT2 retardou a recuperação do pH após um pulso de amônio (NH₄⁺) e reduziu as concentrações de sódio intracelular, ações consistentes com a inibição de NHE1 e que foram atenuadas quando associado cariporide, um antagonista específico de NHE1. Em oposição a estes achados, Chung e colaboradores não identificaram nenhum efeito dos inibidores de SGLT2 para retardar a recuperação do pH após um pulso de NH₄⁺ ou para reduzir as concentrações intracelulares de sódio, desafiando os achados de Baartscheer *et al* (98-100). Nesse contexto, Osaka e seus colaboradores documentaram a inibição de NHE1 com o uso de luseogliflozina, mas com efeito substancialmente menor do que aquele observado com cariporide (101). Adicionalmente, a colaboração do Prof. Hall com o grupo do Prof. Li também não obteve sucesso na tentativa de demonstrar o docking significativo da molécula de empagliflozina ao trocador NHE1 (102). Diante deste conjunto de evidências, o papel da inibição do NHE1 na mediação dos benefícios cardiovasculares das gliflozinas permanece em discussão, postula-se atualmente que se houver de fato algum efeito dos inibidores de SGLT2 para atenuar os aumentos de sódio intracelular, este efeito provavelmente deva ocorrer em menor magnitude quando comparado aos seus efeitos na redução do estresse celular e na modificação da corrente tardia de sódio (103-104).

A expressão e a atividade de SGLT2 estão elevadas nas células do TP de pacientes DM2, como resultado de um mecanismo regulatório mal adaptativo, que contribui para a manutenção da hiperglicemia (47,48). Neste trabalho, demonstramos a hiperexpressão proteica e gênica de SGLT2 no modelo de IC não relacionado ao DM2, muito provavelmente resultado da hiperativação do sistema nervoso simpático e/ou sistema renina - angiotensina renal (SRA)(105). Estudos *in vitro* sugerem que a relação entre SGLT2 e a hiperativação do SRA possa ocorrer de forma bidirecional, uma vez que o aumento da captação de glicose pelo TP também leva à ativação do SRA (106,107). No entanto, estudo recente com ratos hipertensos não diabéticos demonstraram que a dapagliflozina exerce efeito anti-hipertensivo sem alterar a expressão de componentes intrarrenais do SRA ou mesmo a atividade de canais ou outros transportadores de sódio

ao longo do néfron (108). Por outro lado, achados recentes apontam que a inibição de SGLT2 atenua a atividade simpática renal e reduz o conteúdo de norepinefrina renal em camundongos mantidos com dieta rica em gordura (109). Além do que, a denervação renal em ratos com IC foi capaz de reduzir a expressão de SGLT2 renal e a aplicação direta de norepinefrina em células renais gerou o aumento da expressão proteica de SGLT2 (110).

Uma vez que o aumento na atividade eferente renal leva ao mecanismo renorreflexo simpatoexcitatório (111), seria plausível estimar que as gliflozinas exerçam indiretamente a inibição simpática cardíaca através da modulação da aferência renal. O entusiasmo pela hipótese cardiorrenal de que os iSGLT2 atuem principalmente como “antagonistas neuro-hormonais nefrocêntricos” ganha força em torno da expressão principal de SGLT2 no TP renal, com a co-localização e interação funcional com NHE3. Ademais, a estimulação das inervações simpáticas renais também está associada com a maior atividade do NHE3 na membrana apical do TP e acompanhada por respostas antinatriuréticas e antidiuréticas (90,112). Em vez do controle glicêmico, o bloqueio localizado da captação de glicose no TP pelos iSGLT2 seria o mecanismo subjacente capaz de gerar a “inibição-gatilho” da atividade simpática renal e reduzir secundariamente a hiperfunção de NHE3 no TP renal de pacientes com IC.

Em síntese, os dados deste trabalho demonstram que a empagliflozina confere benefícios renais e cardíacos em ratos com IC não diabéticos, restaurando o estado euvolêmico, ao menos em parte, via preservação da TFG e inibição da reabsorção de sódio por NHE3. Nosso estudo fornece também novas evidências a literatura de que a hiperexpressão de SGLT2 corresponda a um dos mecanismos de disfunção do TP, contribuindo significativamente no desenvolvimento e progressão da IC, além de fornecer amparo fisiopatológico com prováveis mecanismos subjacentes à cardio e nefroproteção induzida pelos iSGLT2 em diversos ensaios clínicos com pacientes portadores de IC.

6. CONCLUSÕES

Nosso estudo demonstra que a empagliflozina restaura a euvolemia em ratos não diabéticos com insuficiência cardíaca, preservando a TFG, a massa renal e inibindo a reabsorção de sódio mediada por NHE3 no TP. Demonstra também melhora no remodelamento cardíaco, com atenuação da hipertrofia do VD, menor fibrose intersticial e hipertrofia miocitária no VE. Além disto, documentamos a desregulação tubular proximal na IC com a hiperexpressão de SGLT2. A atenuação da disfunção túbulo-glomerular constitui provavelmente importante mecanismo pelo qual os inibidores de SGLT2 reduzem a progressão de doença e a hospitalização por IC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Savarese G, Becher PM, Lund LH, Seferovic P, Rosano G, Coats AJ. Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology. *Cardiovascular Research*. 2022;
2. Cook TD, Greene SJ, Kalogeropoulos AP, Fonarow GC, Zea R, Swedberg K, et al. Temporal changes in postdischarge mortality risk after hospitalization for heart failure (from the EVEREST Trial). *The American Journal of Cardiology*. 2016;117(4):611–6.
3. Solomon S, Dobson J, Pocock S, Skali H, McMurray J, Granger C, et al. Candesartan in Heart failure: Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) Investigators. Influence of nonfatal hospitalization for heart failure on subsequent mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2007;116(13):1482–7.
4. O'Connor CM, Miller AB, Blair JE, Konstam MA, Wedge P, Bahit MC, et al. Causes of death and rehospitalization in patients hospitalized with worsening heart failure and reduced left ventricular ejection fraction: results from Efficacy of Vasopressin Antagonism in Heart Failure Outcome Study with Tolvaptan (EVEREST) program. *American heart journal*. 2010;159(5):841–9.
5. Jencks SF, Williams MV, Coleman EA. Rehospitalizations among patients in the Medicare fee-for-service program. *New England Journal of Medicine*. 2009;360(14):1418–28.
6. Albuquerque D, Barros E Silva P, Lopes R, Hoffmann C, Nogueira P, Reis H, et al. Main results of the first Brazilian Registry of Heart Failure (BREATHE). *European Heart Journal*. 2022;43(Supplement_2):ehac544-1078.
7. MacDonald MR, Petrie MC, Varyani F, Östergren J, Michelson EL, Young JB, et al. Impact of diabetes on outcomes in patients with low and preserved ejection fraction heart failure: an analysis of the Candesartan in Heart failure: Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) programme. *European heart journal*. 2008;29(11):1377–85.
8. Zhou L, Deng W, Zhou L, Fang P, He D, Zhang W et al. Prevalence, incidence and risk factors of chronic heart failure in the type 2 diabetic population: systematic review. *Curr Diabetes Rev*. 2009 Aug;5(3):171-84
9. Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D, Allen LA, Byun JJ, Colvin MM, et al. 2022 AHA/ACC/HFSA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*. 2022;79(17):e263–421.
10. Rohde LEP, Montera MW, Bocchi EA, Clausell NO et al. Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica e Aguda. *Arq. Bras. Cardiol*. 2018;111(3):436-59.
11. Abraham WT, Lowes BD, Ferguson DA, Odom J, Kim JK, Robertson AD, et al. Systemic hemodynamic, neurohormonal, and renal effects of a steady-state infusion of human brain natriuretic peptide in patients with hemodynamically decompensated heart failure. *Journal of cardiac failure*. 1998;4(1):37–44.
12. Stead EA, Warren JV. The protein content of the extracellular fluid in normal subjects after venous congestion and in patients with cardiac failure, anoxemia, and fever. *The Journal of Clinical Investigation*. 1944;23(2):283–7.

13. Miller WL. Fluid volume overload and congestion in heart failure: time to reconsider pathophysiology and how volume is assessed. *Circulation: Heart Failure*. 2016;9(8):e002922.
14. Cadnapaphornchai, M.A., et al., Pathophysiology of sodium and water retention in heart failure. *Cardiology*, 2001. 96(3-4): p. 122-31.
15. Braunwald E. Heart failure. *JACC Heart Fail*. 2013; 1 (1): 1–20. This is a review article on epidemiology, pathophysiology, and recent developments in the management of HF.
16. Brum PC, Rolim NP, Bacurau AV, Medeiros A. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2006;78:485–503.
17. Chatterjee K. Neurohormonal activation in congestive heart failure and the role of vasopressin. *The American journal of cardiology*. 2005;95(9):8–13.
18. Are EM. Quantitative Two-dimensional Echocardiographic Measurements Are Major Predictors of Adverse Cardiovascular Events After Acute Myocardial Infarction. 1994;
19. Konstam MA, Udelson JE, Anand IS, Cohn JN. Ventricular remodeling in heart failure: a credible surrogate endpoint. *J Card Fail*. 2003 Oct;9(5):350-3
20. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European heart journal*. 2021;42(36):3599–726.
21. Mullens W, Damman K, Testani JM, Martens P, Mueller C, Lassus J, et al. Evaluation of kidney function throughout the heart failure trajectory—a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *European journal of heart failure*. 2020;22(4):584–603.
22. Mullens W, Verbrugge FH, Nijst P, Tang WHW. Renal sodium avidity in heart failure: from pathophysiology to treatment strategies. *European heart journal*. 2017;38(24):1872–82.
23. Metra M, Davison B, Bettari L, Sun H, Edwards C et al. Is worsening renal function an ominous prognostic sign in patients with acute heart failure? The role of congestion and its interaction with renal function. *Circ Heart Fail* 5:54–62, 2012
24. Verbrugge FH, Dupont M, Steels P, Grieten L, Swennen Q, Tang WW, et al. The kidney in congestive heart failure: ‘are natriuresis, sodium, and diuretics really the good, the bad and the ugly?’ *European Journal of Heart Failure*. 2014;16(2):133–42.
25. Verbrugge FH, Grieten L, Mullens W. Management of the cardiorenal syndrome in decompensated heart failure. *Cardiorenal Med* 2014;4:176–188.
26. Meneton P. Comparative roles of the renal apical sodium transport systems in blood pressure control. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2000;11(suppl 2):S135–9.
27. Torp M, Brønd L, Hadrup N, Nielsen J, Praetorius J et al. Losartan decreases vasopressin-mediated cAMP accumulation in the thick ascending limb of the loop of Henle in rats with congestive heart failure. *Acta physiologica*. 2007;190(4):339–50.

28. Lütken SC, Kim SW, Jonassen T, Marples D et al. Changes of renal AQP2, ENaC, and NHE3 in experimentally induced heart failure: response to angiotensin II AT1 receptor blockade. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2009;297(6):F1678–88.
29. Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, et al. NHE3: a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1993;265(5):F736–42.
30. Schultheis, P.J., et al., Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet*, 1998. 19(3): p. 282-5.
31. Inoue BH, dos Santos L, Pessoa TD, Antonio EL, Pacheco BP, Savignano FA, et al. Increased NHE3 abundance and transport activity in renal proximal tubule of rats with heart failure. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2012;302(1):R166–74.
32. Karmazyn M, Liu Q, Gan XT, Brix BJ, Fliegel L. Aldosterone increases HE-1 expression and induces NHE-1-dependent hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Hypertension*. 2003;42:1171–1176.
33. Fujisawa G, Okada K, Muto S, Fujita N, Itabashi N et al. Na/H exchange isoform 1 is involved in mineralocorticoid/salt-induced cardiac injury. *Hypertension*. 2003; 41:493–498.
34. Kocinsky HS, Girardi AC, Biemesderfer D, Nguyen T, Mentone S, Orłowski J, et al. Use of phospho-specific antibodies to determine the phosphorylation of endogenous Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 at PKA consensus sites. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2005;289(2):F249–58.
35. Kurashima K, Frank HY, Cabado AG, Szabó EZ et al. Identification of sites required for down-regulation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 activity by cAMP-dependent protein kinase: phosphorylation-dependent and-independent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(45):28672–9.
36. Dynia DW, Steinmetz AG, Kocinsky HS. NHE3 function and phosphorylation are regulated by a calyculin A-sensitive phosphatase. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2010;298(3):F745–53.
37. Kocinsky HS, Dynia DW, Wang T, Aronson PS. NHE3 phosphorylation at serines 552 and 605 does not directly affect NHE3 activity. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2007;293(1):F212–8.
38. Girardi AC, Di Sole F. Deciphering the mechanisms of the Na⁺/H⁺ exchanger-3 regulation in organ dysfunction. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2012;302(11):C1569–87.
39. Sonalker PA, Tofovic SP, Bastacky SI, Jackson EK. Chronic noradrenaline increases renal expression of NHE-3, NBC-1, BSC-1 and aquaporin-2. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2008;35(5-6):594–600..
40. Marsenic O. Glucose control by the kidney: an emerging target in diabetes. *American Journal of Kidney Diseases*. 2009;53(5):875–83.
41. Vallon V, Platt KA, Cunard R, Schroth J, Whaley J et al. SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011;22(1):104–12.
42. DeFronzo RA, Norton L, Abdul-Ghani M. Renal, metabolic and cardiovascular considerations of SGLT2 inhibition. *Nature Reviews Nephrology*. 2017;13(1):11–26.

43. Braunwald E. SGLT2 inhibitors: the statins of the 21st century. 2022;
44. Von Mering J. Über künstlichen Diabetes. *Centralbl Med Wiss* 1886;22:31–35
45. Alvarado FC, Crane RK. Phlorizin as a competitive inhibitor of the active transport of sugars by hamster small intestine in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1962;56:170–172.
46. Tsujihara K, Hongu M, Saito K et al. Na⁺-glucose cotransporter inhibitors as antidiabetics. I. Synthesis and pharmacological properties of 4'-dehydroxyphlorizin derivatives based on a new concept. *Chem Pharm Bull* 1996;44:1174–1180.
47. Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, Smith CD, Hong G, Brown J. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes*. 2005;54(12):3427–34.
48. Wang XX, Levi J, Luo Y, Myakala K, Herman-Edelstein M et al. SGLT2 Protein Expression Is Increased in Human Diabetic Nephropathy: SGLT2 protein inhibition decreases renal lipid accumulation, inflammation, and the development of nephropathy in diabetic mice. *J Biol Chem* 2017 292: 5335-5348
49. Nelson RG, Bennett PH, Beck GJ, Tan M, Knowler WC, Mitch WE, et al. Development and progression of renal disease in Pima Indians with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*. 1996;335(22):1636–42.
50. Ali A, Bain S, Hicks D, Newland Jones P, Patel DC et al. SGLT2 inhibitors: cardiovascular benefits beyond HbA1c—translating evidence into practice. *Diabetes Therapy*. 2019;10(5):1595–622.
51. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D et al; EMPA-REG OUTCOME Investigators. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2015; 373:2117–2128
52. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, de Zeeuw D et al. CANVAS Program Collaborative Group. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2017 Aug 17;377(7):644-657
53. Mosenzon O, Wiviott SD, Cahn A, Rozenberg A et al. Effects of dapagliflozin on development and progression of kidney disease in patients with type 2 diabetes: an analysis from the DECLARE-TIMI 58 randomised trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019Aug;7(8):606-617
54. Minze MG, Will KJ, Terrell BT, Black RL, Irons BK. Benefits of SGLT2 Inhibitors Beyond Glycemic Control - A Focus on Metabolic, Cardiovascular and Renal Outcomes. *Curr Diabetes Rev*. 2018;14(6):509-517.
55. Satoh H. Pleiotropic effects of SGLT2 inhibitors beyond the effect on glycemic control. *Diabetol Int*. 2018 Aug 14;9(4):212-214.
56. Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Pocock SJ, Carson P, et al. Cardiovascular and renal outcomes with empagliflozin in heart failure. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(15):1413–24.
57. Anker SD, Butler J, Filippatos G, Ferreira JP, Bocchi E, Böhm M, et al. Empagliflozin in heart failure with a preserved ejection fraction. *New England Journal of Medicine*. 2021;385(16):1451–61.
58. Solomon SD, McMurray JJV, Claggett B, de Boer RA et al. DELIVER Trial Committees and Investigators. Dapagliflozin in Heart Failure with Mildly Reduced





- or Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med*. 2022 Sep 22;387(12):1089-1098. doi: 10.1056/NEJMoa2206286. Epub 2022
59. Pessoa TD, Campos LCG, Carraro-Lacroix L, Girardi AC, Malnic G. Functional role of glucose metabolism, osmotic stress, and sodium-glucose cotransporter isoform-mediated transport on Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 activity in the renal proximal tubule. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2014;25(9):2028–39.
 60. Borges-Júnior FA, Silva CA, Crajoinas RO, Castelo-Branco RC et al. Empagliflozin inhibits NHE3 activity in the proximal tubule of normotensive and hypertensive rats. *The FASEB Journal*, 2018, p. Abstract Number: 620.619.
 61. Johns, TN; Olson, BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*. 1954 Nov;140(5):675-82.
 62. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *European Heart Journal-Cardiovascular Imaging*. 2015;16(3):233–71.
 63. Martins FL, Bailey MA, Girardi ACC: Endogenous activation of glucagon-like peptide-1 receptor contributes to blood pressure control: Role of proximal tubule Na¹/H¹ exchanger isoform 3, renal angiotensin II, and insulin sensitivity. *Hypertension* 76: 839–848, 2020 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14868
 64. Inoue BH, Arruda-Junior DF, Campos LC, Barreto AL et al.: Progression of microalbuminuria in SHR is associated with lower expression of critical components of the apical endocytic machinery in the renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 305: F216–F226, 2013 10.1152/ajprenal.00255.2012
 65. Gerdes AM, Liu Z, Zimmer HG. Changes in nuclear size of cardiac myocytes during the development and progression of hypertrophy in rats. *Cardioscience*. 1994;5(3):203-8.
 66. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11(4):447-55.
 67. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193: 265–275, 1951
 68. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680–5.
 69. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP: Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26: 509–515, 2004 10.1023/b:bile.0000019559.84305.47
 70. Malnic G, and de Mello-Aires M. Kinetic study of bicarbonate reabsorption in proximal tubule of the rat. *Am J Physiol* 220: 1759-1767, 1971
 71. Vallon V, Schwark JR, Richter K, Hropot M. Role of Na(1)/H(1) exchanger NHE3 in nephron function: Micropuncture studies with S3226, an inhibitor of NHE3. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F375–F379, 2000 10.1152/ajprenal.2000.278.3.F375
 72. Veiras LC, Girardi ACC, Curry J, Pei L, Ralph DL, Tran A, et al.: Sexual dimorphic pattern of renal transporters and electrolyte homeostasis. *J Am Soc Nephrol* 28: 3504–3517, 2017 10.1681/ASN.2017030295

73. Crajoinas RO, Lessa LMA, Carraro-Lacroix LR, Davel APC et al.: Posttranslational mechanisms associated with reduced NHE3 activity in adult vs. young prehypertensive SHR. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F872–F881, 2010 10.1152/ajprenal.00654.2009
74. Guazzi M, Naeije R: Pulmonary hypertension in heart failure: Pathophysiology, pathobiology, and emerging clinical perspectives. *J Am Coll Cardiol* 69: 1718–1734, 2017 10.1016/j.jacc.2017.01.051
75. Heerspink HJ, Kosiborod M, Inzucchi SE, Cherney DZ. Renoprotective effects of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors. *Kidney international*. 2018;94(1):26–39.
76. Kawanami D, Matoba K, Takeda Y, Nagai Y, Akamine T, Yokota T, et al. SGLT2 inhibitors as a therapeutic option for diabetic nephropathy. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(5):1083.
77. Jackson AM, Dewan P, Anand IS, Bělohávek J, Bengtsson O, de Boer RA, et al. Dapagliflozin and diuretic use in patients with heart failure and reduced ejection fraction in DAPA-HF. *Circulation*. 2020;142(11):1040–54.
78. Hallow KM, Helmlinger G, Greasley PJ, McMurray JJ, Boulton DW. Why do SGLT2 inhibitors reduce heart failure hospitalization? A differential volume regulation hypothesis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2018;20(3):479–87.
79. Chowdhury B, Luu AZ, Luu VZ, Kabir MG, Pan Y, Teoh H, et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces mortality and prevents progression in experimental pulmonary hypertension. *Biochemical and biophysical research communications*. 2020;524(1):50–6.
80. Nassif ME, Qintar M, Windsor SL, Jermyn R, Shavelle DM, Tang F, et al. Empagliflozin effects on pulmonary artery pressure in patients with heart failure: results from the EMBRACE-HF trial. *Circulation*. 2021;143(17):1673–86.
81. Connelly KA, Zhang Y, Visram A, Advani A, Batchu SN, Desjardins JF, et al. Empagliflozin improves diastolic function in a nondiabetic rodent model of heart failure with preserved ejection fraction. *JACC: Basic to Translational Science*. 2019;4(1):27–37.
82. Brown AJ, Gandy S, McCrimmon R, Houston JG, Struthers AD, Lang CC. A randomized controlled trial of dapagliflozin on left ventricular hypertrophy in people with type two diabetes: the DAPA-LVH trial. *European heart journal*. 2020;41(36):3421–32.
83. Gamaza-Chulián S, Díaz-Retamino E, González-Testón F et al. Effect of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors on left ventricular remodelling and longitudinal strain: a prospective observational study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2021 Sep 21;21(1):456.
84. Verma S, Mazer CD, Yan AT, Mason T, Garg V, Teoh H, et al. Effect of empagliflozin on left ventricular mass in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease: the EMPA-HEART CardioLink-6 randomized clinical trial. *Circulation*. 2019;140(21):1693–702.
85. Adamson C, Docherty KF, Heerspink HJL, de Boer RA, Damman K et al. Initial Decline (Dip) in Estimated Glomerular Filtration Rate After Initiation of Dapagliflozin in Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction: Insights From DAPA-HF. *Circulation*. 2022 Aug 9;146(6):438-449.

86. Zhang Y, Nakano D, Guan Y, Hitomi H, Uemura A, Masaki T, et al. A sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor attenuates renal capillary injury and fibrosis by a vascular endothelial growth factor–dependent pathway after renal injury in mice. *Kidney International*. 2018;94(3):524–35.
87. Pirklbauer M, Schupart R, Fuchs L, Staudinger P, Corazza U, Sallaberger S, et al. Unraveling reno-protective effects of SGLT2 inhibition in human proximal tubular cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2019;316(3):F449–62.
88. Aboryag NB, Mohamed DM, Dehe L, Shaqura M et al Histopathological Changes in the Kidney following Congestive Heart Failure by Volume Overload in Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:6894040.Epub 2017 Jul 31
89. Packer M. Activation and inhibition of sodium-hydrogen exchanger is a mechanism that links the pathophysiology and treatment of diabetes mellitus with that of heart failure. *Circulation*. 2017;136(16):1548–59.
90. Pontes RB, Crajoinas RO, Nishi EE, Oliveira-Sales EB, Girardi AC, Campos RR, et al. Renal nerve stimulation leads to the activation of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 via angiotensin II type I receptor. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2015;308(8):F848–56.
91. Crajoinas RO, Polidoro JZ, Carneiro de Morais CP, Castelo-Branco RC et al. Angiotensin II counteracts the effects of cAMP/PKA on NHE3 activity and phosphorylation in proximal tubule cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2016;311(5):C768–76.
92. Coady MJ, El Tarazi A, Santer R, Bissonnette P, Sasseville LJ, Calado J, et al. MAP17 is a necessary activator of renal Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2017;28(1):85–93.
93. Pribanic S, Gisler SM, Bacic D, Madjdpour C, Hernando N, Sorribas V, et al. Interactions of MAP17 with the NaPi-IIa/PDZK1 protein complex in renal proximal tubular cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2003;285(4):F784–91.
94. Thomson R, Thomson B, Girardi A, Kocher O, Aronson P. Interaction of NHE3 with the proximal tubule brush border scaffolding protein PDZKI. In *Federation Amer Soc Exp Biol* 9650, MD 20814-3998 USA; 2004. p. A320–A320.
95. Onishi A, Fu Y, Patel R, Darshi M, Crespo-Masip M, Huang W, et al. A role for tubular Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 in the natriuretic effect of the SGLT2 inhibitor empagliflozin. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2020;319(4):F712–28.
96. Chan LKY, Wang Y, Ng EKW, Leung PS. Na⁺/H⁺ exchanger 3 blockade ameliorates type 2 diabetes mellitus via inhibition of sodium-glucose co-transporter 1-mediated glucose absorption in the small intestine. *Diabetes Obes Metab*. 2018;20:709–717.
97. Nakamura TY, Iwata Y, Arai Y, Komamura K, Wakabayashi S. Activation of Na⁺/H⁺ exchanger 1 is sufficient to generate Ca²⁺ signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res*. 2008;103:891–899.
98. Baartscheer A, Schumacher CA, Wüst RC, Fiolet JW et al. Empagliflozin decreases myocardial cytoplasmic Na⁺ through inhibition of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger in rats and rabbits. *Diabetologia*. 2017;60:568–573.
99. Uthman L, Baartscheer A, Bleijlevens B, Schumacher CA et al. Class effects of SGLT2 inhibitors in mouse cardiomyocytes and hearts: inhibition of Na⁺/H⁺

- exchanger, lowering of cytosolic Na⁺ and vasodilation. *Diabetologia*. 2018;61:722–726.
100. Chung YJ, Park KC, Tokar S, Eykyn TR, Fuller W et al. SGLT2 inhibitors and the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger-1: the plot thickens. *Cardiovasc Res*. 2021;117:2702–2704.
 101. Osaka N, Mori Y, Terasaki M, Hiromura M, Saito T, Yashima H, et al. Luseogliflozin inhibits high glucose-induced TGF-β 2 expression in mouse cardiomyocytes by suppressing NHE-1 activity. *Journal of International Medical Research*. 2022;50(5):03000605221097490.
 102. Li X, Lu Q, Qiu Y, do Carmo JM, Wang Z, da Silva AA, et al. Direct Cardiac Actions of the Sodium Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor Empagliflozin Improve Myocardial Oxidative Phosphorylation and Attenuate Pressure-Overload Heart Failure. *Journal of the American Heart Association*. 2021;10(6):e018298.
 103. Philippaert K, Kalyaanamoorthy S, Fatehi M, Long W, Soni S, Byrne NJ, et al. Cardiac late sodium channel current is a molecular target for the sodium/glucose cotransporter 2 inhibitor empagliflozin. *Circulation*. 2021;143(22):2188–204.
 104. Zhang H, Uthman L, Bakker D, Sari S, Chen S, Hollmann MW, et al. Empagliflozin decreases lactate generation in an NHE-1 dependent fashion and increases α-ketoglutarate synthesis from palmitate in type II diabetic mouse hearts. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2020;7:592233.
 105. Silva Dos Santos D, Polidoro JZ, Borges-Júnior FA et al. Cardioprotection conferred by sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: A renal proximal tubule perspective. *Am J Physiol Cell Physiol* 318:C328–C336, 2020 10.1152/ajpcell.00275.2019
 106. Zhang SL, Filep JG, Hohman TC, Tang SS, Ingelfinger JR, Chan JS. Molecular mechanisms of glucose action on angiotensinogen gene expression in rat proximal tubular cells. *Kidney international*. 1999;55(2):454–64.
 107. Wang J, Shibayama Y, Kobori H, Liu Y, Kobara H, Masaki T, et al. High glucose augments angiotensinogen in human renal proximal tubular cells through hepatocyte nuclear factor-5. *PLoS One*. 2017;12(10):e0185600.
 108. Kravtsova O, Bohovyk R, Levchenko V, Palygin O et al. SGLT2 inhibition effect on salt-induced hypertension, RAAS, and Na⁺ transport in Dahl SS rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2022 Jun 1;322(6):F692-F707.
 109. Herat LY, Magno AL, Rudnicka C, Hricova J et al. SGLT2 inhibitor-induced sympathoinhibition: a novel mechanism for cardiorenal protection. *JACC Basic Transl Sci*. 2020;5:169–179.
 110. Katsurada K, Nandi SS, Sharma NM, Patel KP. Enhanced expression and function of renal SGLT2 (sodium-glucose cotransporter 2) in heart failure: role of renal nerves. *Circulation: Heart Failure*. 2021;14(12):e008365.
 111. Kopp UC. Role of renal sensory nerves in physiological and pathophysiological conditions. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2015;308(2):R79–95.
 112. Healy V, Thompson C, Johns E. The adrenergic regulation of proximal tubular Na⁺/H⁺ exchanger 3 in the rat. *Acta Physiologica*. 2014;210(3):678–89.

Empagliflozin Inhibits Proximal Tubule NHE3 Activity, Preserves GFR, and Restores Euvolemia in Nondiabetic Rats with Induced Heart Failure

Flávio A. Borges-Júnior,¹ Danúbia Silva dos Santos,¹ Acaris Benetti,¹ Juliano Z. Polidoro,¹ Aline C.T. Wisnivesky,¹ Renato O. Crajoinas,¹ Ednei L. Antônio,² Leonardo Jensen,¹ Bruno Caramelli ,⁴ Gerhard Malnic ,³ Paulo J. Tucci ,² and Adriana C.C. Girardi ¹

¹Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil

²Cardiology Division, Department of Medicine, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

³Department of Physiology and Biophysics, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

⁴Interdisciplinary Medicine in Cardiology Unit, Heart Institute (InCor), University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil

ABSTRACT

Background SGLT2 inhibitors reduce the risk of heart failure (HF) mortality and morbidity, regardless of the presence or absence of diabetes, but the mechanisms underlying this benefit remain unclear. Experiments with nondiabetic HF rats tested the hypothesis that the SGLT2 inhibitor empagliflozin (EMPA) inhibits proximal tubule (PT) NHE3 activity and improves renal salt and water handling.

Methods Male Wistar rats were subjected to myocardial infarction or sham operation. After 4 weeks, rats that developed HF and sham rats were treated with EMPA or untreated for an additional 4 weeks. Immunoblotting and quantitative RT-PCR evaluated SGLT2 and NHE3 expression. Stationary *in vivo* microperfusion measured PT NHE3 activity.

Results EMPA-treated HF rats displayed lower serum B-type natriuretic peptide levels and lower right ventricle and lung weight to tibia length than untreated HF rats. Upon saline challenge, the diuretic and natriuretic responses of EMPA-treated HF rats were similar to those of sham rats and were higher than those of untreated HF rats. Additionally, EMPA treatment prevented GFR decline and renal atrophy in HF rats. PT NHE3 activity was higher in HF rats than in sham rats, whereas treatment with EMPA markedly reduced NHE3 activity. Unexpectedly, SGLT2 protein and mRNA abundance were upregulated in the PT of HF rats.

Conclusions Prevention of HF progression by EMPA is associated with reduced PT NHE3 activity, restoration of euvolemia, and preservation of renal mass. Moreover, dysregulation of PT SGLT2 may be involved in the pathophysiology of nondiabetic HF.

JASN 32: ●●●-●●●, 2021. doi: <https://doi.org/10.1681/ASN.2020071029>

Sodium-glucose cotransporter type 2 (SGLT2) inhibitors, also known as gliflozins, suppress glucose reabsorption in the renal proximal tubule (PT), leading to substantial glycosuria, thereby lowering hyperglycemia in patients with type 2 diabetes (T2D).^{1,2} Gliflozins were initially developed as antidiabetic agents but have recently emerged as among the most impactful cardiovascular drugs. Three cardiovascular outcome trials consistently showed that SGLT2 inhibitors

Received July 19, 2020. Accepted February 15, 2021.

F.A.B.-J. and D.S.d.S. contributed equally to this work.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Prof. Adriana C.C. Girardi, Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology Heart Institute, University of Sao Paulo Medical School, Avenida Doutor Eneas de Carvalho Aguiar, 44, 10º andar, Bloco II, 05403-900 Sao Paulo, Brazil. Email: adriana.girardi@incor.usp.br

Copyright © 2021 by the American Society of Nephrology

remarkably reduce cardiovascular mortality and hospitalization for heart failure (HF) in patients with T2D.^{3–5} Most recently, the phase 3 Dapagliflozin and Prevention of Adverse Outcomes in Heart Failure⁶ and the Empagliflozin Outcome Trial in Patients with Chronic Heart Failure with Reduced Ejection Fraction⁷ studies have announced that these SGLT2 inhibitors reduce cardiovascular death and HF progression when added to the standard therapy in patients with HF and reduced ejection fraction, regardless of the presence or absence of diabetes. As such, these trial findings may likely expand the clinical use of gliflozins beyond diabetes care. Nevertheless, the mechanisms underlying the unprecedented benefits of gliflozins in HF management remain elusive.

The presence of renal dysfunction portends adverse outcomes in patients with HF. HF is often associated with sodium and water retention, a reduction in renal blood flow and GFR, renal tubular damage, and proteinuria.^{8,9} Despite its cardioprotective actions, SGLT2 inhibitors have also been shown to confer renoprotection by preserving glomerular function, delaying progression to dialysis, reducing urinary protein excretion, and decreasing renal damage in patients with diabetes and rodent models.^{10–12} However, it remains to be established whether gliflozins are capable of ameliorating renal function in the setting of nondiabetic HF.

The natriuresis elicited by gliflozins, with consequent hemodynamic improvements, constitutes a plausible mechanism underpinning the positive cardiorenal outcomes of these drugs.^{13,14} Interestingly, although SGLT2 inhibitors cause a persistent 7% reduction in the extracellular volume of patients with T2D,¹⁵ mice lacking SGLT2 do not exhibit volume depletion, suggesting that the blockade of SGLT2-mediated sodium reabsorption *per se* is not sufficient to affect sodium balance and extracellular fluid homeostasis. In this regard, by coupling a mathematical model of renal function and volume homeostasis with clinical data, Hallow *et al.*¹⁶ predicted that inhibition of apical PT Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 (NHE3) is required for the gliflozin-induced natriuretic effect. In line with the *in silico* predictions, we previously demonstrated that the nonselective sodium-glucose cotransporter inhibitor phlorizin remarkably reduces PT NHE3 activity.¹⁷ We also found that SGLT2, but not sodium-glucose cotransporter type 1, colocalizes with NHE3 in the apical membrane of PT cells.¹⁷ However, the influence of selective SGLT2 inhibitors on NHE3 activity under physiologic or pathophysiologic conditions has yet to be evaluated.

On the basis of these observations, this study aimed to test the hypothesis that an SGLT2 inhibitor is capable of exerting renoprotective effects in the setting of nondiabetic HF. More specifically, we investigated whether empagliflozin improves renal salt and water handling in rats with HF, and we sought to elucidate the potential mechanisms. Furthermore, we examined whether selective SGLT2 inhibition is capable of down-regulating PT NHE3 in HF.

Significance Statement

SGLT2 inhibitors represent a class of drugs that were originally developed for improving glycemic control. Cardiovascular outcome trials designed to evaluate cardiovascular safety yielded unexpected and unprecedented evidence of the cardiorenal benefits of SGLT2 inhibitors. Many hypotheses have been proposed to explain the mechanisms underlying these effects. Our study demonstrates that SGLT2 inhibition is associated with the restoration of euvolemia in nondiabetic heart failure (HF) rats by preserving GFR and renal mass and inhibiting proximal tubule NHE3-mediated sodium reabsorption. The attenuation of kidney dysfunction may constitute an essential mechanism by which SGLT2 inhibitors attenuate HF development and progression in either the presence or absence of diabetes.

METHODS

Reagents

Jardiance tablets (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG) containing 25 mg of empagliflozin were purchased from a local pharmacy. These tablets were then sent to the Rhoister Company (Araçoiaba da Serra, Sao Paulo, Brazil) to be added to the rodent chow for daily empagliflozin treatment (10 mg/kg per day). Untreated animals received a control diet without empagliflozin. Chemicals were obtained from Merck (Darmstadt, Germany) unless otherwise specified.

Animal Protocols, Surgical Procedures, and Drug Treatment

All experiments were carried out following the ethical principles in animal research of the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Sao Paulo Medical School (protocol no. 941/2018). Eight-week-old male Wistar rats (200–250 g; $n=104$) were obtained from the Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. Rats were randomly assigned to sham surgery ($n=36$) or myocardial infarction ($n=68$) by ligation of the left anterior descending (LAD) artery (Supplemental Figures 1 and 2) as previously described.¹⁸ Briefly, rats were anesthetized with ketamine (50 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) intraperitoneally and placed under positive pressure ventilation (rate: 90 breaths per minute; tidal volume: 2.5 ml on a Harvard rodent respirator [model 683; Harvard Apparatus Co., South Natick, MA]). The thoracotomy was performed at the fourth intercostal space. After that, the heart was exposed, and the LAD coronary artery was isolated and ligated approximately 3 mm from the origin of the aorta using 6–0 Prolene suture. The chest was closed, and the animals were carefully moved from ventilation support. Sham-operated rats were submitted to a similar surgical procedure, except for LAD coronary artery ligation. After recovering from surgery, the rats were maintained in a temperature- and humidity-controlled environment with a 12-hour dark/light cycle at the Heart Institute (InCor) animal facility. Food and water were supplied *ad libitum*.

Four weeks after surgery, HF was characterized by echocardiographic evaluation of left ventricle (LV) systolic function and serum levels of brain natriuretic peptide (BNP). HF was considered when the fractional area change (FAC; *i.e.*, the percentage of change in the LV cross-sectional area between diastole and systole) was lower than 40% and when circulating levels of BNP were higher than 1.0 ng/ml (Supplemental Figure 3, Supplemental Table 1). Myocardial infarction rats that developed HF ($n=38$) and sham ($n=36$) rats were randomly divided into two groups and treated with empagliflozin (10 mg/kg per day supplied in the rat chow) or not treated. After 4 weeks (post-treatment), the rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of pentobarbital (50 mg/kg) and subsequently euthanized by cervical dislocation. The study design is depicted in Supplemental Figure 2.

Echocardiography

Rats were anesthetized with 1.5% isoflurane in O₂ and placed in the left lateral decubitus position to obtain cardiac images. Images were captured and analyzed using Sonos 5500 ultrasound equipment (Philips Medical System, Bothell, WA) with a 12- to 14-MHz transducer (2-cm depth with fundamental and harmonic imaging). Echocardiographic images were acquired by placing the cursor of pulsed-wave Doppler in the LV outflow tract to display the end of aortic ejection and the onset of mitral inflow. Tracing the endocardial border by planimetry, excluding the papillary muscle, in end diastolic and end systolic frames provides values for left ventricle end diastolic area (LVEDA) and LV end systolic area (Supplemental Table 1). Applying this in the following equation would give an FAC of LV from diastole to systole: $FAC = [LVEDA - (LV \text{ end systolic area}/LVEDA)] \times 100\%$. Echocardiography was performed by an investigator who was blind to the experimental groups.

Determination of BNP Serum Levels

Before randomization, blood samples were withdrawn from the retro-orbital sinus under isoflurane anesthesia. At post-treatment, blood was collected from the abdominal aorta artery at the time of death. The samples were immediately transferred into vacuum tubes with a gel separator (BD vacutainer SST II Advance; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) and centrifugated at 4000 rpm for 10 minutes at 4°C to obtain serum. Serum levels of BNP were measured by ELISA (BNP 32 Rat ELISA kit; Abcam) according to the manufacturer's instructions.

BP Measurements

Tail-cuff BP was measured noninvasively in conscious restrained rats by plethysmography (BP Blood Pressure Analysis System 2000; Visitech System, Apex, NC) as previously described.¹⁹

Renal Function Evaluation

The rats were individually housed and placed in metabolic cages (Tecniplast; Buguggiate, VA, Italy) as previously

described.²⁰ Food and water consumption was determined daily and subsequently normalized to body weight. Urine samples were collected for 24 hours and used to determine urinary flow, sodium, creatinine, and proteinuria. Creatinine clearance was used to estimate the GFR.

Blood and Urine Analyses

Fasting blood glucose levels were measured using the ACCU-CHECK Performa meter (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). The serum and urinary sodium concentrations were determined by flame photometry (DM-62; Digimed, Sao Paulo, Brazil). The serum urea, urinary glucose, proteinuria, and creatinine concentrations were measured by colorimetric methods using Labtest kits (Labtest; Lagoa Santa, Brazil). The experiments were carried out following the manufacturer's instructions.

Saline Challenge

Animals were anesthetized with isoflurane and were injected intraperitoneally with a volume of warmed (37°C) saline (0.9% NaCl) equivalent to 10% of their body weight (vol/wt). After that, the rats were placed immediately in metabolic cages, where they quickly woke up. Urine volume, collected for 3 hours, was measured with a graduate pipette, and urinary sodium concentration was measured by flame photometry (DM-62; Digimed). The results were expressed as the percentage of the fluid and sodium load that was injected.

Biometric and Morphometric Analyses

The lungs, heart, and kidneys were excised and weighed. The organ weight was normalized by left tibia length. The lungs were stored in an oven to dry at 70°C for 48 hours. The relative water content of lung tissue was calculated using the following equation: lung water content (in percentage) = $(\text{wet lung weight} - \text{dry lung weight})/\text{lung wet weight} \times 100$. The kidneys were immediately removed for isolation of renal cortical proteins for immunoblotting, tissue fixation for immunohistochemistry, or freezing for RNA extraction and quantitative RT-PCR.

Preparation of Renal Cortical Homogenate

The right kidney from rats was removed and cut in half on a midsagittal plane, and the cortices were isolated and homogenized in ice-cold PBS buffer (150 mM sodium chloride, 2.8 mM monobasic sodium phosphate, 7.2 mM dibasic sodium phosphate, pH 7.4) containing protease inhibitors (0.7 mg/ml pepstatin, 0.5 mg/ml leupeptin, and 40 mg/ml phenylmethanesulfonyl fluoride) and phosphatase inhibitors (50 mM sodium pyrophosphate decahydrate and 15 mM sodium fluoride) using a Potter–Elvehjem-style tissue grinder (POLIMIX PX-SR50E; Kinematica Inc., Luzern, Switzerland). The homogenate was centrifuged at 4500 rpm for 10 minutes at 4°C. The supernatant was collected and stored at –80°C. Protein concentration was determined by the Lowry method.²¹

SDS-PAGE and Immunoblotting

Renal cortical proteins were solubilized in Laemmli sample buffer and separated by SDS-PAGE using 7.5% polyacrylamide gels. The separated proteins were transferred from the gel to a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P; Merck Millipore, Bedford, MA) at 350 mA for 8–10 hours at 4°C with a TE 62 Transfer Cooled Unit (GE HealthCare, Piscataway, NJ) and stained with Ponceau S. Then, the polyvinylidene difluoride membranes were incubated with blocking solution (5% nonfat dry milk and 0.1% Tween 20 in PBS, pH 7.4) for 1 hour and overnight (4°C) with specific primary antibodies: a polyclonal antibody against SGLT2 (1:1000, NBP1–92384; Novus Biologicals, Centennial, CO); a mouse mAb against NHE3, clone 3H3 (1:1000; Peter Aronson, Yale University, New Haven, CT)²²; a phosphospecific mAb against NHE3, PS552-NHE3, clone 14D5²² (1:1000; Santa Cruz Biotech, Dallas, TX); or a polyclonal antibody against β -actin (1:5000, ab8227; Abcam). Proteins were detected using horseradish peroxidase–conjugated secondary antibodies (1:2000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). The bound antibodies were detected using an enhanced chemiluminescence system (GE HealthCare) according to the manufacturer's protocols. The membranes were then placed in a digital imaging system (ImageQuant LAS 4000 mini; GE HealthCare). Immunoblot quantification was performed using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Immunohistochemistry

The left kidney was cut in half on a midsagittal plane, fixed in 10% formalin for 24 hours, stored in 70% ethanol, and then embedded in paraffin. Four-micrometer kidney paraffin sections were incubated with 3% H₂O₂ for 3 minutes (five times at room temperature) to block endogenous peroxidase activity and then rinsed with Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST). Nonspecific reactions were blocked in 2% goat serum for 20 minutes and then incubated with the rabbit polyclonal anti-SGLT2 antibody (1:100) or the rabbit polyclonal anti-cleaved caspase-3 antibody (1:100, 9661; Cell Signaling Technology, Danvers, MA). After 18 hours of incubation at 4°C, kidney sections were washed three times for 5 minutes with TBST and incubated with a secondary antibody. After washing in TBST, tissue sections were incubated with peroxidase-conjugated universal immunoenzyme polymer, anti-rabbit solution [Histofine Simple Stain MAX PO(MULTI); Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan] for 30 minutes at room temperature. After washing in TBST, immunoreactions were detected with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB-Zymed) for 7 minutes and counterstained with hematoxylin. The images were acquired under a $\times 400$ -magnification light microscope using the software Quantimet Leica (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany).

Terminal Deoxynucleotidyl Transferase–Mediated Digoxigenin-Deoxyuridine Nick-End Labeling Assay

DNA fragmentation was detected using an *in situ* cell death detection kit (ApopTag Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit

S7100; Merck Millipore), according to the manufacturer's instructions. Briefly, tissue sections were deparaffinized in xylene and ethanol, rehydrated in serial ethanol dilutions, and permeabilized with proteinase K. The reaction with terminal deoxynucleotidyl transferase and alkaline phosphatase conversion was performed, and the cross-sections were examined by light microscopy. The percentage of terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated digoxigenin-deoxyuridine nick-end labeling–positive nuclei was quantified by an observer blinded to the four conditions using the Quantimet-Leica software (Leica Biosystems).

Quantitative Real-Time RT-PCR

Total RNA was isolated from the left kidney using Trizol (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions, quantified (ND-1000 spectrophotometer; NanoDrop Technologies, Inc.), and treated with DNase-I. First-strand cDNA synthesis was performed using Super-Script III Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's guidelines. Details about the oligonucleotide primers used in this study are listed in Supplemental Table 2. Reactions were carried using SYBR Green PCR Master Mix-PE (Thermo Fisher Scientific) on an ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystem, Foster City, CA). The comparative threshold cycle method was used for data analyses. All samples were assayed in triplicate. Transcripts for three reference genes (*Gapdh*, *Actb*, and *Ppia*) were determined (Supplemental Table 2). The BestKeeper software²³ was used to identify the best suit reference gene (*Gapdh*) for data normalization under our experimental conditions. Relative expression was analyzed by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

In Vivo Stationary Microperfusion

In vivo stationary microperfusion was used to determine NHE3 activity in the PT to test the hypothesis that selective SGLT2 inhibition is capable of downregulating PT NHE3 in HF. Rats (four to five per group) were anesthetized by intramuscular administration of tiletamine/zolazepam (50 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). After tracheostomy, the left jugular vein was cannulated for infusion of 3% mannitol in isotonic saline solution at a rate of 0.05 ml/min. The kidney was isolated using a lumbar approach, immobilized *in situ* using Ringer agar in a Lucite cup under a microscope, and adequately illuminated. PTs were punctured using a double-barreled micropipette, one barrel being used to inject FDC green-colored Ringer perfusion solution (100 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, FDC green, and raffinose to reach isotonicity) and the other being used to inject Sudan black-colored castor oil, the latter used to block the injected fluid column in the lumen. The tubules were perfused with the Ringer solution in the presence or absence of the selective NHE3 inhibitor, S3226 (10 μ M).²⁴ The voltage between the microelectrode barrels, representing luminal H⁺ activity, was continuously recorded by a computer equipped with an analog to digital conversion board (Lynx, Sao Paulo, Brazil) for data acquisition and processing.

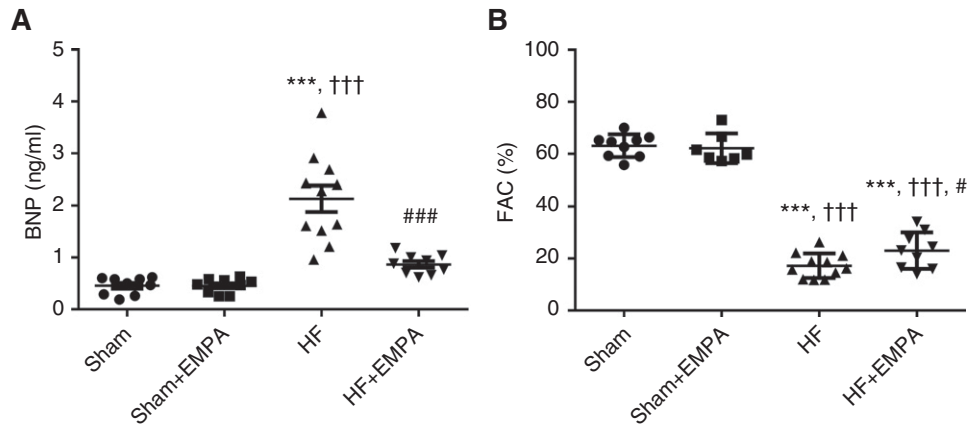


Figure 1. Treatment with empagliflozin (EMPA) normalizes serum BNP concentration and slightly improves LV systolic function in nondiabetic rats with induced HF. Doppler echocardiography and quantitative determination of serum BNP were performed in sham and HF rats after 4 weeks of treatment with EMPA or no treatment. (A) The circulating levels of BNP and (B) the FAC of sham and HF rats treated with EMPA or untreated. The values represent individual measurements and the means \pm SEM. *** P <0.001 versus sham; ††† P <0.001 versus sham + EMPA; # P =0.02 versus HF; ### P <0.001 versus HF.

To measure luminal pH, PTs were impaled by a double-barreled asymmetric microelectrode, the larger barrel containing H^+ ion-sensitive ion exchange resin silanized with hexamethyldisilazane (Sigma Fluka, Buchs, Switzerland).

Tubular acidification rate was assessed by injecting a drop-let of the perfusion solution between the oil columns and following the luminal pH changes toward the steady-state level (stationary perfusion). The luminal acidification was also assessed in the presence or absence of the selective NHE3 inhibitor, S3226 (10 μ M), in the control perfusion solution. For evaluation of acidification kinetics, luminal $[H^+]$ values from each pH recovery curve were fitted with Origin 2020 (Origin Lab, Northampton, MA) by using the following equation:

$$[H^+]_{(t)} = \frac{[H^+]_{\text{stat}}}{(1 + b \cdot e^{-kt})}, \quad (1)$$

where $[H^+]_{\text{stat}}$ represents stationary luminal $[H^+]$, k stands for the intrinsic kinetic constant of each fitted curve, and b is a constant that determines the initial pH values for each fitted curve and can be mathematically defined as $b = \frac{[H^+]_{\text{stat}}}{[H^+]_0} - 1$.

We then calculated the rate of luminal acidification until the half-maximum point of each curve by

$$\Delta [H^+] / \Delta t = \frac{[H^+]_{\text{half-max}} - [H^+]_0}{t_{1/2}}, \quad (2)$$

where $t_{1/2}$ is the predicted time at that point [$t_{1/2} = \frac{\ln(b)}{k}$] and $[H^+]_{\text{half-max}} = \frac{[H^+]_{\text{stat}}}{2}$.

Statistical Analyses

The results are reported as the mean \pm SEM, with n indicating the number of rats. Comparisons among the means were

assessed using a two-way ANOVA followed by the Tukey *post hoc* test. A P value <0.05 was considered significant, considering the main effect of empagliflozin treatment, the main effect of HF induction, the interaction between empagliflozin treatment and HF induction, and the differences among groups.

RESULTS

Empagliflozin Lowers Serum BNP Levels and Reduces the Right Ventricle and Lung Weight-Tibia Length Ratio in Nondiabetic HF Rats

As shown in Figure 1, untreated HF rats displayed higher serum BNP levels and lower FAC than sham animals. Importantly, treatment with empagliflozin restored serum BNP to levels similar to those of sham groups (Figure 1A). Also, empagliflozin treatment induced a modest but significant improvement in FAC compared with untreated HF rats (23% \pm 2% versus 17% \pm 1%, P =0.02) (Figure 1B). As expected, serum BNP levels and FAC were similar between untreated and empagliflozin-treated sham rats.

The biometric characteristics of the animals are shown in Table 1. The average body weights were similar among the untreated HF, empagliflozin-treated HF, and empagliflozin-treated sham groups (but not the untreated sham group). Therefore, organ weight was normalized by tibial length, which remained unchanged among the four groups of rats. The biometric analysis showed that untreated HF rats exhibited a higher right ventricle (RV) weight-tibia length ratio, a higher lung-tibia length ratio, and more pulmonary congestion than the sham groups. In contrast, empagliflozin prevented pulmonary congestion and RV hypertrophy.

Table 1. Biometric parameters of sham and nondiabetic rats with myocardial-induced HF treated with the SGLT2 inhibitor empagliflozin or untreated

Biometric Parameters	Sham, n=16	Sham + EMPA, n=20	HF, n=14	HF + EMPA, n=17
Body weight, g	450±10	403±10 ^a	398±5 ^a	406±9 ^b
Tibia length, mm	41.2±0.3	40.4±0.3	40.5±0.2	40.7±0.4
LV/tibia, mg/mm	20.4±0.8	17.6±0.4 ^a	20.1±0.5 ^c	20.6±0.4 ^d
RV/tibia, mg/mm	6.26±0.24	5.22±0.16	8.90±0.96 ^{e,f}	6.39±0.30 ^g
LV + RV/tibia, mg/mm	26.7±1.1	22.8±0.5 ^a	29.0±1.1 ^f	27.0±0.6 ^d
Lung/tibia, mg/mm	32.2±1.5	31.8±1.1	44.7±3.3 ^{e,f}	31.7±1.7 ^g
Lung water content, %	78.3±0.4	77.9±0.4	80.6±0.2 ^{e,f}	79.1±0.3 ^g
LK + RK/tibia, mg/mm	64±1	67±1	58±1 ^{a,f}	67±1 ^g

The values represent individual measurements and the means ± SEM. EMPA, empagliflozin; LK, left kidney; RK, right kidney.

^aP=0.005 versus sham.

^bP=0.01 versus sham.

^cP=0.01 versus sham + EMPA.

^dP=0.002 versus sham + EMPA.

^eP<0.001 versus sham.

^fP<0.001 versus sham + EMPA.

^gP<0.001 versus HF.

Glycosuria, Diuresis, and Natriuresis Induced by Empagliflozin Were Higher in HF Rats than in Sham Rats
 Glycosuria markedly increased in both the sham and HF groups treated with empagliflozin compared with untreated

animals (Figure 2A). Interestingly, the effect of empagliflozin on glycosuria was more pronounced in HF rats than in sham rats (Figure 2A). Changes in urinary glucose excretion among the four groups of rats were not associated with changes in

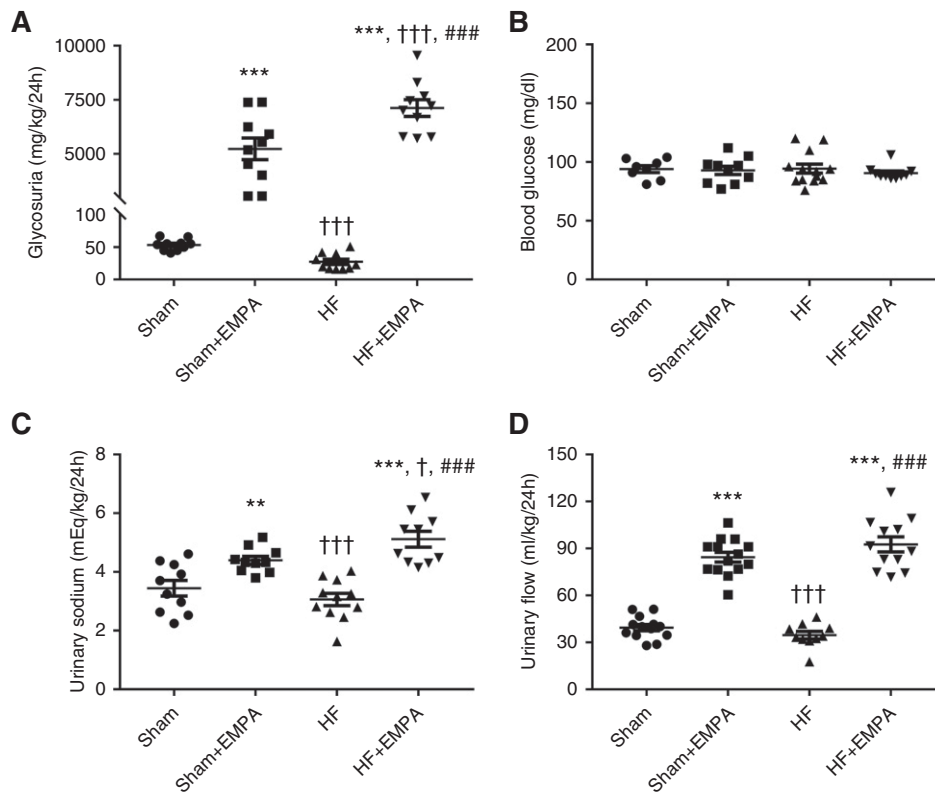


Figure 2. Treatment with empagliflozin (EMPA) induces higher glycosuria, urinary flow, and sodium excretion in HF rats than in sham rats. Rats were individually placed into metabolic cages for 24-hour urine collection to measure glycosuria, urinary flow, and urinary sodium. Blood was collected from 12-hour fasting rats for the determination of blood glucose. (A) Glycosuria. (B) Blood glucose concentration. (C) Urinary sodium. (D) Urinary flow. Experiments were performed 4 weeks after treatment with EMPA or no treatment. The values represent individual measurements and the means ± SEM. **P=0.005 versus sham; ***P<0.001 versus sham; †P=0.02 versus sham + EMPA; †††P<0.001 versus sham + EMPA; ###P<0.001 versus HF.

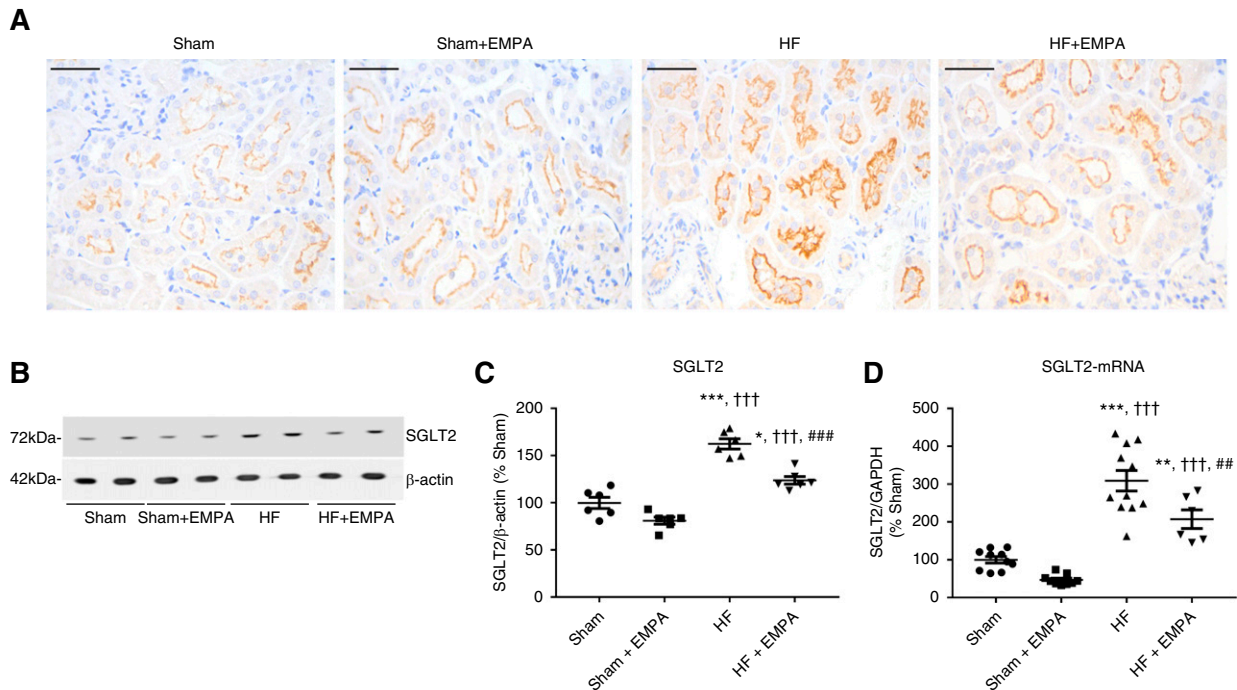


Figure 3. SGLT2 is overexpressed in the PT of nondiabetic HF rats. (A) Representative immunohistochemical staining of SGLT2 in the PT of sham and HF rats treated with empagliflozin (EMPA) or untreated. Scale bar: 50 μ m. (B) Representative immunoblots from SDS-PAGE of renal cortical proteins isolated from sham and HF rats treated with EMPA or untreated and probed with antibodies against SGLT2 and β -actin. (C) Graphic representation of the relative levels of SGLT2 protein abundance in the renal cortex of the four groups of rats. (D) Graphic representation of the relative mRNA expression of SGLT2 in the renal cortex of sham and HF rats treated with EMPA or untreated. The levels of SGLT2 mRNA were measured using quantitative PCR, and GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) was used as an internal control. The values represent individual measurements and the means \pm SEM (Supplemental Material). * $P=0.01$ versus sham; ** $P=0.006$ versus sham; *** $P<0.001$ versus sham; ††† $P<0.001$ versus sham + EMPA; ## $P=0.008$ versus HF; ### $P<0.001$ versus HF.

blood glucose concentration (Figure 2B). Similar to the findings of urinary glucose excretion, urinary sodium (Figure 2C) and urinary flow (Figure 2D) were higher in the empagliflozin-treated sham group and the HF group than in the untreated groups. Moreover, urinary sodium was greater in empagliflozin-treated HF rats than in empagliflozin-treated sham animals (Figure 2C). The increase in urinary flow and urinary sodium in empagliflozin-treated rats was accompanied by increased water and sodium intake (Supplemental Figure 4).

PT SGLT2 is Overexpressed in Nondiabetic HF Rats

SGLT2 expression and activity are upregulated in the diabetic kidney^{25,26}; however, how this transporter is regulated in nondiabetic HF remains unknown. Therefore, we tested the hypothesis that HF rats display increased protein and mRNA-SGLT2 expression compared with controls. SGLT2 protein expression in the PT of the four groups of rats was first evaluated by immunohistochemistry. Representative photomicrographs of SGLT2-stained sections of the renal PTs of HF and sham rats are presented in Figure 3A. The results of this qualitative analysis strongly suggested that SGLT2 was upregulated in nondiabetic HF rats compared with sham rats and HF rats treated with empagliflozin (Figure 3A).

Second, SGLT2 protein abundance was evaluated in the renal cortex by immunoblotting. As seen in Figure 3, B and C, SGLT2 protein abundance was enhanced in the renal cortex of HF rats compared with both untreated and empagliflozin-treated sham rats.

Finally, we found that higher SGLT2 protein abundance was accompanied by higher SGLT2 mRNA expression levels in the renal cortices of HF rats compared with sham animals (Figure 3D). Interestingly, empagliflozin treatment lowered SGLT2 expression at both the protein and mRNA levels compared with untreated HF rats (Figure 3, B–D). However, SGLT2 expression remained higher in empagliflozin HF rats than in sham rats (Figure 3, B–D).

Empagliflozin Restores Euvolemia in Nondiabetic HF Rats

First, we tested the acute renal capability of handling salt and water of HF and sham rats that were either treated with empagliflozin or untreated (Figure 4).

Untreated HF rats excreted less fluid (Figure 4A) and salt (Figure 4B) than sham rats and empagliflozin-treated HF rats. Similar fluid and salt load percentages were excreted by untreated sham- and empagliflozin-treated HF rats (Figure 4, A and B).

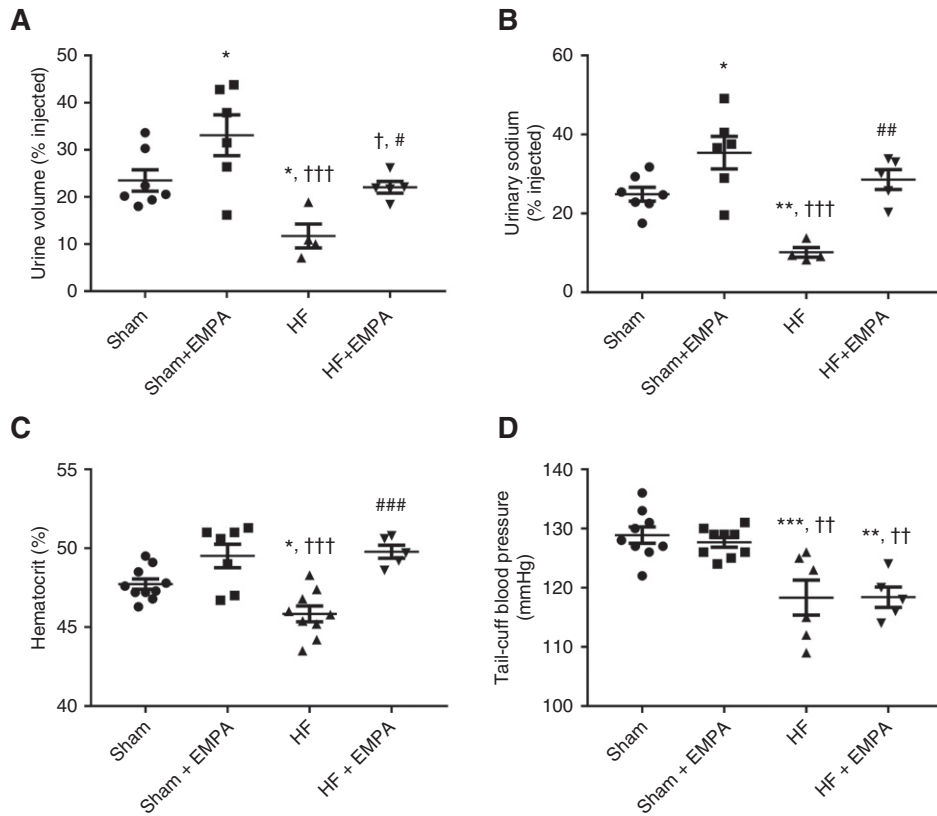


Figure 4. Treatment with empagliflozin (EMPA) improves the volume status in nondiabetic HF rats. (A and B) Rats were challenged with an intraperitoneal bolus of warm saline equivalent to 10% of their body weight and were then placed in metabolic cages for 3-hour urine collection. (A) The percentage of the fluid load that was excreted within 3 hours of the saline challenge. (B) The percentage of the sodium load that was excreted within 3 hours of the saline challenge. (C) Blood samples were collected to measure hematocrit. (D) BP was measured using tail-cuff plethysmography. Experiments were conducted 4 weeks after treatment with EMPA or no treatment. The values represent individual measurements and the means \pm SEM. * $P=0.03$ versus sham; ** $P=0.005$ versus sham; *** $P<0.001$ versus sham; † $P=0.02$ versus sham + EMPA; †† $P=0.005$ versus sham + EMPA; ††† $P<0.001$ versus sham + EMPA; # $P=0.02$ versus HF; ## $P=0.003$ versus HF; ### $P<0.001$ versus HF.

Second, changes in hematocrit were evaluated. The hematocrit levels of untreated HF rats were lower than those of sham rats (Figure 4C). Also, treatment with empagliflozin restored the hematocrit of HF rats to levels similar to those of sham rats (Figure 4C).

Third, as seen in Figure 4D, the effects of empagliflozin on reducing extracellular volume in HF rats were not accompanied by reduced BP. Untreated and empagliflozin-treated HF rats exhibited lower tail-cuff BP than sham rats (Figure 4D). In addition, empagliflozin treatment did not affect BP in either sham or HF rats (Figure 4D).

Empagliflozin Prevents the Reduction in GFR, Attenuates Proteinuria, and Preserves Kidney Mass in Nondiabetic HF Rats

As depicted in Figure 5, untreated HF rats exhibited lower GFR (Figure 5A), higher levels of serum urea (Figure 5B), and greater proteinuria (Figure 5C) than the other three groups of rats. In contrast, empagliflozin-treated HF rats exhibited GFR, serum urea, and proteinuria similar to sham groups

(Figure 5). Interestingly, HF rats exhibited a lower kidney weight-tibia length ratio than sham rats, whereas empagliflozin treatment prevented HF-induced kidney atrophy (Table 1).

The lower kidney weight-tibia length ratio in HF rats was associated with a higher percentage of terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated digoxigenin-deoxyuridine nick-end labeling–positive apoptotic renal cells and a higher abundance of cleaved caspase-3 (Figure 6). The extents of renal apoptosis and cleaved caspase-3 protein expression in HF rats were normalized by empagliflozin treatment.

Empagliflozin Inhibits PT NHE3

PT luminal pH was recorded during stationary *in vivo* microperfusion in the presence or absence of the specific NHE3 inhibitor S3226 to assess modulation of NHE3 by empagliflozin in both sham and HF rats. Representative pH recovery recordings for each experimental group are presented in Figure 7, A and B. As illustrated in Figure 7C, the PT acidification rate ($\Delta[H^+]/\Delta t$) was higher in untreated HF rats than in

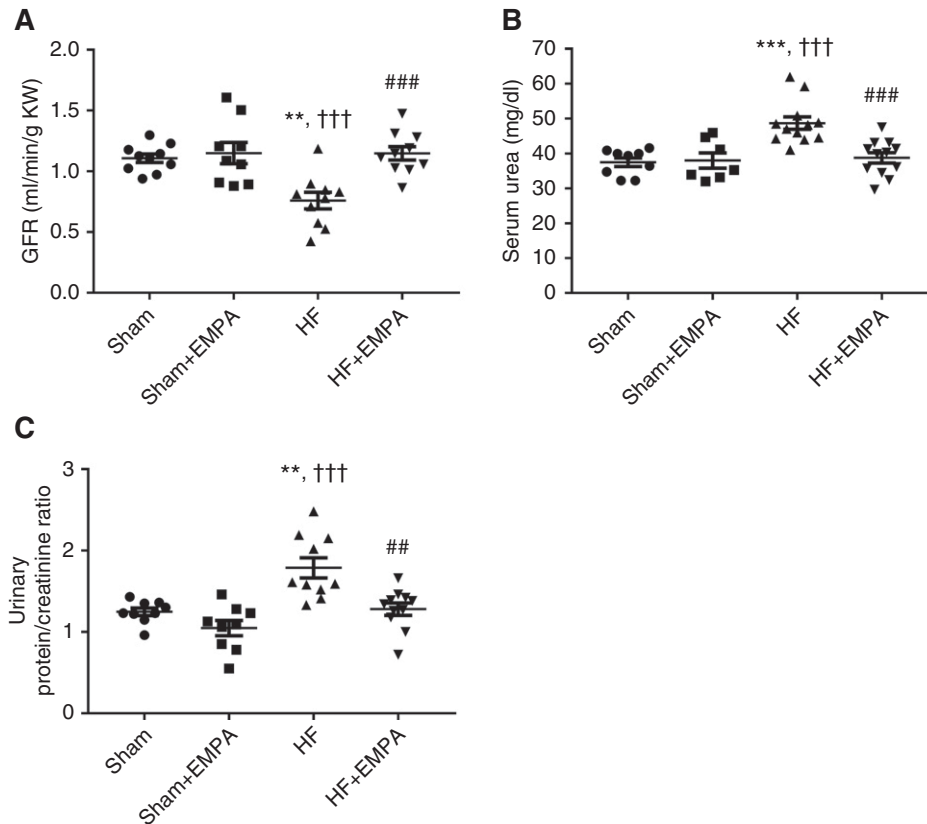


Figure 5. Treatment with empagliflozin (EMPA) prevents the reduction in GFR and attenuates proteinuria in HF rats. Rats were individually placed into metabolic cages for 24-hour urine collection to measure GFR and proteinuria. Blood was collected for the determination of serum urea and creatinine. (A) The GFR was estimated by creatinine clearance and normalized per gram of kidney weight (KW). (B) Serum urea was measured by colorimetry. (C) Graphic representation of the urine protein-creatinine ratio. Proteinuria was measured by colorimetry. Experiments were conducted 4 weeks after treatment with EMPA or no treatment. The values represent individual measurements and the means \pm SEM. ** $P=0.001$ versus sham; *** $P<0.001$ versus sham; ††† $P<0.001$ versus sham + EMPA; ## $P=0.001$ versus HF; ### $P<0.001$ versus HF.

untreated sham rats. Treatment with empagliflozin prominently reduced PT luminal acidification of both HF and sham rats (Figure 7C). Nevertheless, the inhibitory effect of empagliflozin on tubular acidification was more pronounced in HF rats (approximately 70% inhibition versus untreated HF rats) than in sham rats (approximately 45% inhibition versus untreated sham rats). In addition, no differences were observed in tubular acidification among the four groups of rats when their PTs were perfused with the selective NHE3 inhibitor S3226, confirming that differences in H^+ secretion induced by empagliflozin were due to modulation of NHE3 activity (Figure 7D). The increase in PT NHE3 activity in HF rats was accompanied by enhanced NHE3 mRNA levels (Figure 7E) and NHE3 protein abundance (Figure 7, F and G). Conversely, even though empagliflozin reduced PT NHE3 activity, this SGLT2 inhibitor did not affect either cortical NHE3 protein abundance or the mRNA levels of NHE3 in HF or sham rats (Figure 7, E–G). NHE3 phosphorylation at serine 552 (PS552-NHE3) is considered a surrogate for NHE3 inhibition.^{22,27,28} Consistent with higher PT NHE3 activity,

HF rats displayed lower levels of PS552-NHE3 to total NHE3 than the other three groups of rats (Figure 7, F and H). The levels of PS552-NHE3 to total NHE3 were higher in empagliflozin-treated HF rats than in untreated HF rats but lower than in the rats in the sham groups. Importantly, although empagliflozin inhibited NHE3 activity in the PT of sham rats, no differences were found in the levels of PS552-NHE3 to total NHE3 between untreated and empagliflozin-treated sham rats (Figure 7, F and H).

DISCUSSION

This study provides novel experimental evidence that SGLT2 inhibition by empagliflozin exerts renal benefits that may contribute to attenuate HF progression in a nondiabetic setting. Our results demonstrate that empagliflozin preserves glomerular function, prevents HF-induced renal apoptosis and loss of renal mass, and exerts a profound reduction of PT NHE3-mediated sodium reabsorption in an experimental model of

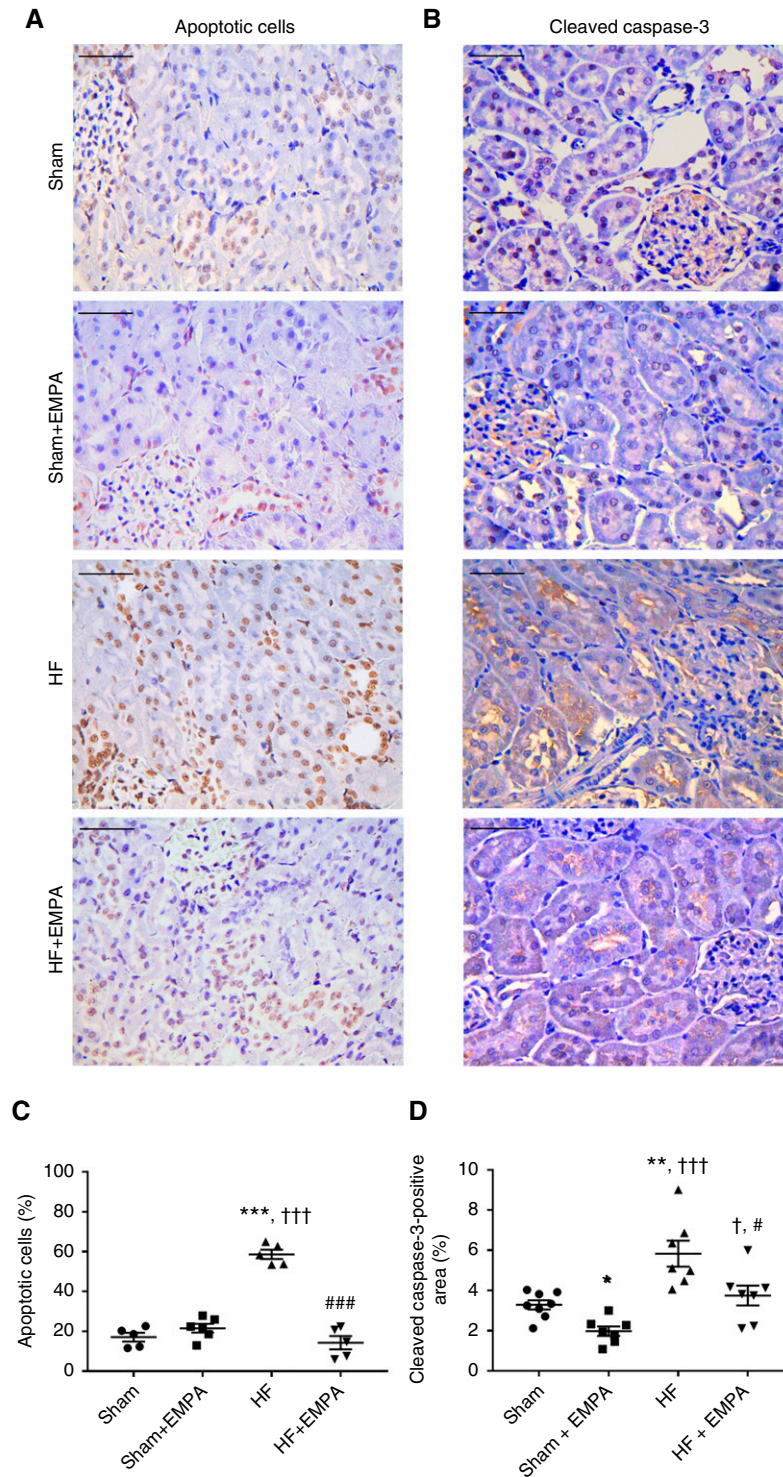


Figure 6. Treatment with empagliflozin (EMPA) normalizes renal apoptosis and cleaved caspase-3 abundance in HF rats. (A and B) Representative photomicrographs of kidney sections ($\times 400$ magnification) from HF and sham rats treated with EMPA or untreated. Scale bar: $50 \mu\text{m}$. (A) Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated digoxigenin-deoxyuridine nick-end labeling assay was used to detect apoptotic cells that undergo extensive DNA degradation. (B) Immunohistochemical staining of cleaved caspase-3. (C) Quantification of apoptotic nuclei and (D) cleaved caspase-3-positive areas were determined in five random fields per slide using the ImageJ software. These analyses were performed by two investigators blinded to the experimental groups. The values represent individual measurements and the means \pm SEM. $*P=0.04$ versus sham; $**P=0.005$ versus sham; $***P<0.001$ versus sham; $^\dagger P=0.02$ versus sham + EMPA; $^\ddagger P<0.001$ versus sham + EMPA; $^\# P=0.02$ versus HF; $^\#\#\# P<0.001$ versus HF.

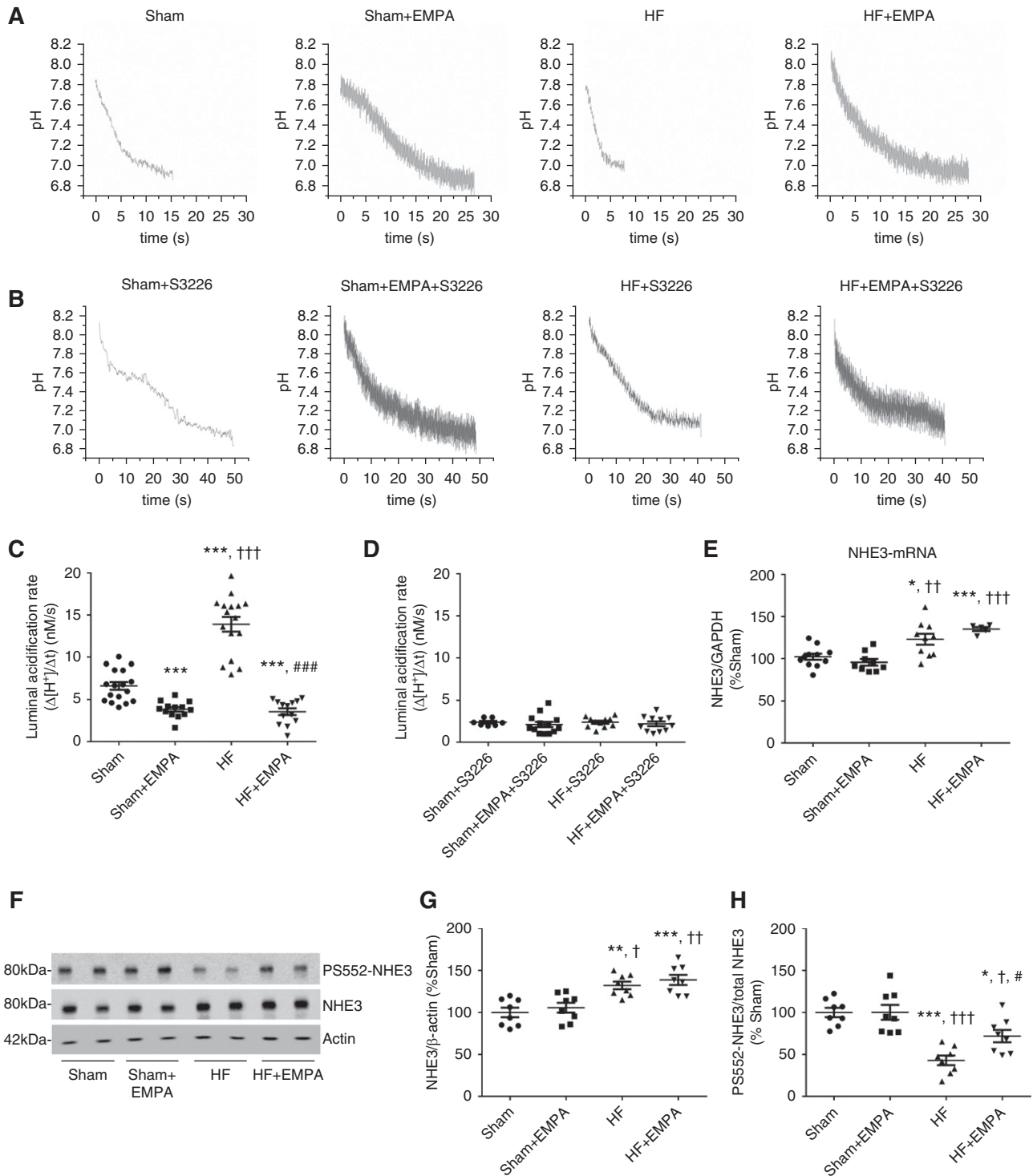


Figure 7. Treatment with empagliflozin (EMPA) inhibits PT NHE3 activity. (A–D) Modulation of NHE3 activity by EMPA was determined by assessing the PT luminal acidification in the presence or absence of 10 μ M S3226, a selective inhibitor of NHE3. (A and C) Representative luminal pH recordings and the rate of luminal acidification in sham and HF rats treated with EMPA or untreated in the absence of S3226. (B and D) Representative luminal pH recordings and the rate of luminal acidification in sham and HF rats treated with EMPA or untreated in the presence of S3226. (E) Graphic representation of the relative mRNA expression of NHE3 in the renal cortex of sham and HF rats treated with EMPA or untreated. The levels of NHE3 mRNA were measured using quantitative PCR, and GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) was used as an internal control. (F) Renal cortical proteins isolated from the four groups of rats were resolved by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were probed with a

myocardial infarction–induced HF. These effects were accompanied by restoration of euolemia, a decrease in circulating levels of BNP, prevention of pulmonary congestion, and mitigation of RV hypertrophy. Moreover, to the best of our knowledge, this is the first report to reveal that SGLT2 is overexpressed in the renal PT of nondiabetic HF rats. Interestingly, empagliflozin not only suppressed SGLT2-mediated glucose reabsorption but also, reduced SGLT2 expression in the renal cortex of nondiabetic HF rats at both the protein and mRNA levels.

Excessive renal sodium avidity and extracellular volume overload are hallmark features of HF that are associated with disease progression and poor prognosis.²⁹ The sodium and water retention that occurs with advanced LV failure can lead to pulmonary edema, increased mean pulmonary arterial pressure, and consequently, RV hypertrophy that is ultimately followed by dysfunction.³⁰ Accordingly, we found that untreated HF rats exhibited a lower natriuretic and diuretic response to a saline challenge, a lower hematocrit, and much higher circulating BNP levels than sham rats. As expected, volume overload in untreated HF rats was accompanied by pulmonary congestion and RV hypertrophy. Conversely, treatment with empagliflozin restored euolemia in HF rats, as evidenced by the improved sodium and water handling by the kidneys and normalization of hematocrit and serum BNP levels. The reduction in volume overload by empagliflozin prevented pulmonary congestion and RV hypertrophy in nondiabetic HF rats. In line with these findings, Chowdhury *et al.*³¹ found that empagliflozin treatment in rats with severe experimental pulmonary hypertension reduced mean pulmonary artery pressure, RV systolic pressure, and RV hypertrophy. Importantly, these hemodynamic benefits were associated with prolonged survival in this model of pulmonary arterial hypertension. These data support the hypothesis that reduced volume overload is one of the mechanisms underlying the observed decrease in HF events in cardiovascular trials with SGLT2 inhibitors.

The potential causes of salt and water retention by the kidneys in HF may include a decreased GFR, increased tubular reabsorption of sodium, or both. This study demonstrates that empagliflozin prevents a decrease in GFR in nondiabetic HF rats. Such a result may appear contradictory at first glance because one would expect that the increased delivery of sodium and chloride to the macula densa, produced by SGLT2 inhibitors, would activate the tubuloglomerular feedback, leading to a decline in GFR. However, GFR preservation in HF rats treated with empagliflozin may be explained, at least in

part, by the finding that this SGLT2 inhibitor can also prevent HF-induced renal atrophy, renal apoptosis, and consequently, kidney dysfunction. Additionally, the preservation of GFR in empagliflozin-treated HF rats might also be due to an improvement in cardiac performance. In this regard, we have found that empagliflozin modestly but significantly improves systolic function in HF rats. It is important to emphasize that, in this study, we performed echocardiography in anesthetized rats as opposed to pharmacologic stress echocardiography, which may constitute a limitation that precluded us from detecting a more pronounced cardiac function benefit in response to empagliflozin treatment.

Reduced renal blood flow due to decreased cardiac output and increased venous congestion is probably the primary mediator of GFR decline and loss of renal mass in HF. However, it remains to be determined whether SGLT2 inhibitors are capable of improving renal perfusion in the setting of nondiabetic cardiac dysfunction. Interestingly, treatment with the SGLT2 inhibitor luseogliflozin prevented endothelial rarefaction, renal hypoxia, and the development of renal fibrosis after renal ischemia-reperfusion in mice through a vascular endothelial growth factor–dependent pathway.³² Furthermore, Pirklbauer *et al.*³³ provided evidence that SGLT2 inhibition blocks the expression of key mediators of renal fibrosis and kidney disease progression in two distinct lines of human PT cells. Therefore, it could be speculated that the renoprotective effects of SGLT2 in nondiabetic HF are mediated not only by improvements in renal hemodynamics but also, by local actions at the level of PT cells.

The upregulation of NHE3 expression and renal PT activity has been implicated in the pathogenesis of HF, which includes sodium retention, volume overload, and peripheral edema.³⁴ Consistent with previous findings from our group,³⁵ we observed increased NHE3 activity, protein abundance, and mRNA levels and decreased PS552-NHE3 in the PT of HF rats. Importantly, in this report, we show for the first time that a selective SGLT2 inhibitor suppressed the activity of PT NHE3. Empagliflozin treatment prominently reduced PT NHE3 function in both HF and sham rats; however, NHE3 inhibition was more pronounced in HF rats. Empagliflozin-induced NHE3 inhibition did not affect NHE3 protein abundance or NHE3 mRNA levels in either sham or HF rats. In contrast, a small but significant increase in PS552-NHE3 levels was observed in empagliflozin-treated HF rats compared with untreated HF rats. As no difference was found in the levels of PS552-NHE3 between untreated and empagliflozin-treated

primary antibody against total NHE3, a phosphospecific antibody that recognizes NHE3 only when it is phosphorylated at serine 552 (PS552-NHE3), and an antibody against β -actin as an internal control. (G) Graphic representation of the relative expression of total NHE3 and (H) the ratio of phosphorylated NHE3 at serine 552 to total NHE3 (PS552-NHE3/total NHE3). The values represent individual measurements and the means \pm SEM (Supplemental Material). * $P=0.02$ versus sham; ** $P=0.002$ versus sham; *** $P<0.001$ versus sham; † $P=0.02$ versus sham + EMPA; †† $P=0.001$ versus sham + EMPA; ††† $P<0.001$ versus sham + EMPA; # $P=0.03$ versus HF; ### $P<0.001$ versus HF.

sham rats, one may speculate that the effect of empagliflozin on PS552-NHE3 in HF rats might be secondary to the attenuation of the maladaptive neurohormonal response in HF. Indeed, both activation of the renal sympathetic nervous system and angiotensin II are known to activate NHE3, at least partly due to a decrease in PS552-NHE3.^{36,37} Nevertheless, the principal mechanism by which SGLT2 inhibition downregulates PT NHE3 activity remains unknown.

SGLT2 expression and activity appear to be upregulated in PT cells of patients with T2D as a result of a maladaptive regulatory mechanism that contributes to the maintenance of hyperglycemia.^{25,26} Here, we report the unprecedented finding that the expression of SGLT2 mRNA and protein is increased in nondiabetic HF. The upregulation of SGLT2 expression in nondiabetic HF may involve hyperactivation of the sympathetic nervous system and/or the renal angiotensin system (RAS), as reviewed elsewhere.¹³ Notably, *in vitro* studies have suggested that the relationship between SGLT2 and RAS may be bidirectional because increased glucose uptake by PT leads to RAS activation.^{38,39} The vicious cycle of SGLT2 upregulation and intrarenal RAS hyperactivation may aggravate extracellular fluid volume disorders and therefore, contribute to HF progression. Likewise, gliflozins may break this vicious cycle by lowering PT glucose uptake and decreasing RAS activation, thereby mitigating the potential stimuli for SGLT2 overexpression.

In summary, our findings demonstrated that empagliflozin confers therapeutic benefits in nondiabetic HF rats by restoring the euvoletic status, most likely due to the preservation of GFR and the inhibition of NHE3-mediated sodium reabsorption. Furthermore, our study provides novel evidence that SGLT2 overexpression may constitute a mechanism for PT dysfunction implicated in HF syndrome development and progression. Aligned with recent clinical data showing that dapagliflozin and empagliflozin confer cardioprotection in nondiabetic patients with HF,^{6,7} our report supports the recommendation of SGLT2 inhibitors in future treatment paradigms for HF management, independent of diabetes status.

DISCLOSURES

A.C.C. Girardi reports scientific advisor or membership with *American Journal of Physiology Cell Physiology*, *Current Research in Physiology*, and *Frontiers in Physiology*. All remaining authors have nothing to disclose.

FUNDING

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Grant 2016/22140-7, by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Grant 307156/2018-4, and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Finance Code 001.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

This article contains the following supplemental material online at <http://jasn.asnjournals.org/lookup/suppl/doi:10.1681/ASN.2020071029/-/DCSupplemental>.

Supplemental Table 1. Values for LV end diastolic area and LV end systolic area.

Supplemental Table 2. Sequences of oligonucleotides used in this study.

Supplemental Figure 1. CONSORT-style diagram.

Supplemental Figure 2. Schematic timeline of the study.

Supplemental Figure 3. Evaluation of BNP and FAC in sham and HF rats before randomization.

Supplemental Figure 4. Evaluation of food and water intake.

Supplemental Material. Full unedited gels for Figures 3 and 7.

REFERENCES

- Ghezzi C, Yu AS, Hirayama BA, Kepe V, Liu J, Scafoglio C, et al.: Dapagliflozin binds specifically to sodium-glucose cotransporter 2 in the proximal renal tubule. *J Am Soc Nephrol* 28: 802–810, 2017 10.1681/ASN.2016050510
- Vallon V, Platt KA, Cunard R, Schroth J, Whaley J, Thomson SC, et al.: SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* 22: 104–112, 2011 10.1681/ASN.2010030246
- Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, et al.; EMPA-REG OUTCOME Investigators: Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 373: 2117–2128, 2015 10.1056/NEJMoa1504720
- Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, de Zeeuw D, Fulcher G, Erondu N, et al.; CANVAS Program Collaborative Group: Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 377: 644–657, 2017 10.1056/NEJMoa1611925
- Wiviott SD, Raz I, Bonaca MP, Mosenzon O, Kato ET, Cahn A, et al.; DECLARE-TIMI 58 Investigators: Dapagliflozin and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 380: 347–357, 2019 10.1056/NEJMoa1812389
- McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE, Køber L, Kosiborod MN, Martinez FA, et al.; DAPA-HF Trial Committees and Investigators: Dapagliflozin in patients with heart failure and reduced ejection fraction. *N Engl J Med* 381: 1995–2008, 2019 10.1056/NEJMoa1911303
- Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Pocock SJ, Carson P, et al.; EMPEROR-Reduced Trial Investigators: Cardiovascular and renal outcomes with empagliflozin in heart failure. *N Engl J Med* 383: 1413–1424, 2020 10.1056/NEJMoa2022190
- Damman K, Testani JM: The kidney in heart failure: An update. *Eur Heart J* 36: 1437–1444, 2015 10.1093/eurheartj/ehv010
- Brisco MA, Testani JM: Novel renal biomarkers to assess cardiorenal syndrome. *Curr Heart Fail Rep* 11: 485–499, 2014 10.1007/s11897-014-0226-4
- Neuen BL, Young T, Heerspink HJL, Neal B, Perkovic V, Billot L, et al.: SGLT2 inhibitors for the prevention of kidney failure in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol* 7: 845–854, 2019 10.1016/S2213-8587(19)30256-6
- Nespoux J, Vallon V: SGLT2 inhibition and kidney protection. *Clin Sci (Lond)* 132: 1329–1339, 2018 10.1042/CS20171298
- Kashihara N, Kidokoro K, Kanda E: Renoprotective effects of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors and underlying mechanisms. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 29: 112–118, 2020 10.1097/MNH.0000000000000561
- Silva Dos Santos D, Polidoro JZ, Borges-Júnior FA, Girardi ACC: Cardioprotection conferred by sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: A renal proximal tubule perspective. *Am J Physiol Cell Physiol* 318: C328–C336, 2020 10.1152/ajpcell.00275.2019

14. Griffin M, Rao VS, Ivey-Miranda J, Fleming J, Mahoney D, Maulion C, et al.: Empagliflozin in heart failure: Diuretic and cardio-renal effects. *Circulation* 142: 1028–1039, 2020 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.045691
15. Lambers Heerspink HJ, de Zeeuw D, Wie L, Leslie B, List J: Dapagliflozin a glucose-regulating drug with diuretic properties in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 15: 853–862, 2013 10.1111/dom.12127
16. Hallow KM, Greasley PJ, Helmlinger G, Chu L, Heerspink HJ, Boulton DW: Evaluation of renal and cardiovascular protection mechanisms of SGLT2 inhibitors: Model-based analysis of clinical data. *Am J Physiol Renal Physiol* 315: F1295–F1306, 2018 10.1152/ajprenal.00202.2018
17. Pessoa TD, Campos LC, Carraro-Lacroix L, Girardi AC, Malnic G: Functional role of glucose metabolism, osmotic stress, and sodium-glucose cotransporter isoform-mediated transport on Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 activity in the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* 25: 2028–2039, 2014 10.1681/ASN.2013060588
18. Johns TN, Olson BJ, et al.: Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann. Surg* 140: 675–682, 1954 10.1097/0000658-195411000-00006
19. Martins FL, Bailey MA, Girardi ACC: Endogenous activation of glucagon-like peptide-1 receptor contributes to blood pressure control: Role of proximal tubule Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3, renal angiotensin II, and insulin sensitivity. *Hypertension* 76: 839–848, 2020 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14868
20. Inoue BH, Arruda-Junior DF, Campos LC, Barreto AL, Rodrigues MV, Krieger JE, et al.: Progression of microalbuminuria in SHR is associated with lower expression of critical components of the apical endocytic machinery in the renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 305: F216–F226, 2013 10.1152/ajprenal.00255.2012
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275, 1951
22. Kocinsky HS, Girardi AC, Biemesderfer D, Nguyen T, Mentone S, Orłowski J, et al.: Use of phospho-specific antibodies to determine the phosphorylation of endogenous Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 at PKA consensus sites. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F249–F258, 2005 10.1152/ajprenal.00082.2004
23. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP: Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Bio-otechnol Lett* 26: 509–515, 2004 10.1023/b:bile.0000019559.84305.47
24. Vallon V, Schwark JR, Richter K, Hropot M: Role of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger NHE3 in nephron function: Micropuncture studies with S3226, an inhibitor of NHE3. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F375–F379, 2000 10.1152/ajprenal.2000.278.3.F375
25. Wang XX, Levi J, Luo Y, Myakala K, Herman-Edelstein M, Qiu L, et al.: SGLT2 protein expression is increased in human diabetic nephropathy: SGLT2 protein inhibition decreases renal lipid accumulation, inflammation, and the development of nephropathy in diabetic mice. *J Biol Chem* 292: 5335–5348, 2017 10.1074/jbc.M117.779520
26. Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, Smith CD, Hong G, Brown J: Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 54: 3427–3434, 2005 10.2337/diabetes.54.12.3427
27. Veiras LC, Girardi ACC, Curry J, Pei L, Ralph DL, Tran A, et al.: Sexual dimorphic pattern of renal transporters and electrolyte homeostasis. *J Am Soc Nephrol* 28: 3504–3517, 2017 10.1681/ASN.2017030295
28. Crajoinas RO, Lessa LMA, Carraro-Lacroix LR, Davel APC, Pacheco BPM, Rossoni LV, et al.: Posttranslational mechanisms associated with reduced NHE3 activity in adult vs. young prehypertensive SHR. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F872–F881, 2010 10.1152/ajprenal.00654.2009
29. Mullens W, Verbrugge FH, Nijst P, Tang WHW: Renal sodium avidity in heart failure: From pathophysiology to treatment strategies. *Eur Heart J* 38: 1872–1882, 2017 10.1093/eurheartj/ehx035
30. Guazzi M, Naeije R: Pulmonary hypertension in heart failure: Pathophysiology, pathobiology, and emerging clinical perspectives. *J Am Coll Cardiol* 69: 1718–1734, 2017 10.1016/j.jacc.2017.01.051
31. Chowdhury B, Luu AZ, Luu VZ, Kabir MG, Pan Y, Teoh H, et al.: The SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces mortality and prevents progression in experimental pulmonary hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 524: 50–56, 2020 10.1016/j.bbrc.2020.01.015
32. Zhang Y, Nakano D, Guan Y, Hitomi H, Uemura A, Masaki T, et al.: A sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor attenuates renal capillary injury and fibrosis by a vascular endothelial growth factor-dependent pathway after renal injury in mice. *Kidney Int* 94: 524–535, 2018 10.1016/j.kint.2018.05.002
33. Pirklbauer M, Schupart R, Fuchs L, Staudinger P, Corazza U, Sallaberger S, et al.: Unraveling reno-protective effects of SGLT2 inhibition in human proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 316: F449–F462, 2019 10.1152/ajprenal.00431.2018
34. Packer M: Activation and inhibition of sodium-hydrogen exchanger is a mechanism that links the pathophysiology and treatment of diabetes mellitus with that of heart failure. *Circulation* 136: 1548–1559, 2017 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030418
35. Inoue BH, dos Santos L, Pessoa TD, Antonio EL, Pacheco BPM, Savignano FA, et al.: Increased NHE3 abundance and transport activity in renal proximal tubule of rats with heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: R166–R174, 2012 10.1152/ajpregu.00127.2011
36. Pontes RB, Crajoinas RO, Nishi EE, Oliveira-Sales EB, Girardi AC, Campos RR, et al.: Renal nerve stimulation leads to the activation of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 via angiotensin II type I receptor. *Am J Physiol Renal Physiol* 308: F848–F856, 2015 10.1152/ajprenal.00515.2014
37. Crajoinas RO, Polidoro JZ, Carneiro de Moraes CP, Castelo-Branco RC, Girardi AC: Angiotensin II counteracts the effects of cAMP/PKA on NHE3 activity and phosphorylation in proximal tubule cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 311: C768–C776, 2016 10.1152/ajpcell.00191.2016
38. Zhang SL, Filep JG, Hohman TC, Tang SS, Ingelfinger JR, Chan JS: Molecular mechanisms of glucose action on angiotensinogen gene expression in rat proximal tubular cells. *Kidney Int* 55: 454–464, 1999 10.1046/j.1523-1755.1999.00271.x
39. Wang J, Shibayama Y, Kobori H, Liu Y, Kobara H, Masaki T, et al.: High glucose augments angiotensinogen in human renal proximal tubular cells through hepatocyte nuclear factor-5. *PLoS One* 12: e0185600, 2017 10.1371/journal.pone.0185600

ONLINE SUPPLEMENTAL DATA

Empagliflozin inhibits proximal tubule NHE3 activity, preserves GFR and restores euvoemia in nondiabetic rats with induced heart failure

Flávio A. Borges-Júnior*¹, Danúbia Silva dos Santos*¹, Acaris Benetti¹, Juliano Z. Polidoro¹, Aline C. T. Wisnivesky¹, Renato O. Crajoinas¹, Ednei L. Antônio², Leonardo Jensen¹, Bruno Caramelli¹, Gerhard Malnic³, Paulo J. Tucci², Adriana C. C. Girardi¹

*equally contributed to this work.

Affiliations

1. Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, São Paulo, Brazil.

2. Cardiology Division, Department of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil.

3. Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo Medical School, São Paulo, São Paulo, Brazil.

Supplemental material Table of Contents

- Supplemental Table S1. Values for LV end-diastolic area (LVEDA) and LV end-systolic area (LVEDS).
- Supplemental Table S2. Sequences of oligonucleotides used in this study.
- Supplemental Figure S1. CONSORT-Style Diagram.
- Supplemental Figure S2. Schematic timeline of the study.
- Supplemental Figure S3. Evaluation of BNP and FAC in sham and HF rats before randomization.
- Supplemental Figure S4. Evaluation of food and water intake.
- Full unedited gels for Figures 3 and 7.

Table S1. Values for LV end-diastolic area (LVEDA) and LV end-systolic area (LVEDS).

	Before randomization			Posttreatment	
	LVEDA (mm ²)	LVEDS (mm ²)		LVEDA (mm ²)	LVEDS (mm ²)
Sham	44.0	16.8	Sham	60.1	22.4
	47.6	15.2		53.9	15.7
	43.2	15.6		44.9	15.6
	57.5	20.8		50.2	17.4
	46.6	19.6		38.9	15.8
	50.1	20.3		44.0	14.6
	54.4	17.7		52.6	19.6
	45.6	17.6		55.1	22.3
	44.2	18.3	51.0	22.5	
	50.5	21.5	Sham+EMPA	48.3	11.3
	46.2	19.8		38.9	15.8
	51.0	21.6		58.3	20.8
	45.9	13.2		53.8	19.4
	49.8	17.8		51.4	21.0
	46.3	19.1		50.2	21.4
	44.0	16.2		44.0	16.8
68.3	52.7	HF		78.7	69.3
68.4	51.0		67.1	52.9	
85.0	66.7		80.6	67.1	
79.7	63.9		94.1	76.6	
61.5	47.8		76.9	64.8	
69.9	58.0		89.2	78.4	
91.6	71.0		88.7	67.1	
80.5	53.2		84.9	66.0	
97.0	77.9		73.6	62.9	
73.2	61.2		95.8	80.4	
98.4	75.4		94.8	83.6	
87.8	68.8		HF+EMPA	91.4	72.8
67.5	49.5			80.9	61.0
80.4	68.3			78.6	60.4
75.0	58.7			102.1	70.1
69.4	56.4			93.4	78.0
69.0	52.0	94.7		66.9	
62.0	45.3	71.9		47.4	
83.2	71.9	89.4		64.7	
99.1	89.7	89.2	74.7		

Table S2. Sequences of oligonucleotides used in this study.

Gene	Primer Sequence 5' to 3'	Size (base pairs)
<i>Gapdh</i>	F - ATGGTGAAGGTCGGTGTG R - GAACTTGCCGTGGGTAGAG	162
<i>Actb</i>	F - CGTTGACATCCGTAAAGACC R - GCCACCAATCCACACAGA	172
<i>Ppia</i>	F - AATGCTGGACCAAACACAAA R - CCTTCTTTCACCTTCCCAA	101
<i>Slc5a2</i>	F - TGAGTGGAATGCGCTCTTTG R - GAGGCATGGTAATCACTCCG	86
<i>Slc9a3</i>	F - CATGAGCTGAATTTGAAGGATGC R - GCTGAAGTCCACATTGACCAT	114

Gapdh - Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; *Actb* - Beta-actin; *Ppia* - Peptidylprolyl Isomerase A (cyclophilin A); *Slc5a2* - Solute Carrier Family 5 Member 2 (SGLT2); *Slc9a3* - Solute Carrier Family 9 Member A3 (NHE3); F - forward; R - reverse.

Figure S1. CONSORT-Style Diagram.

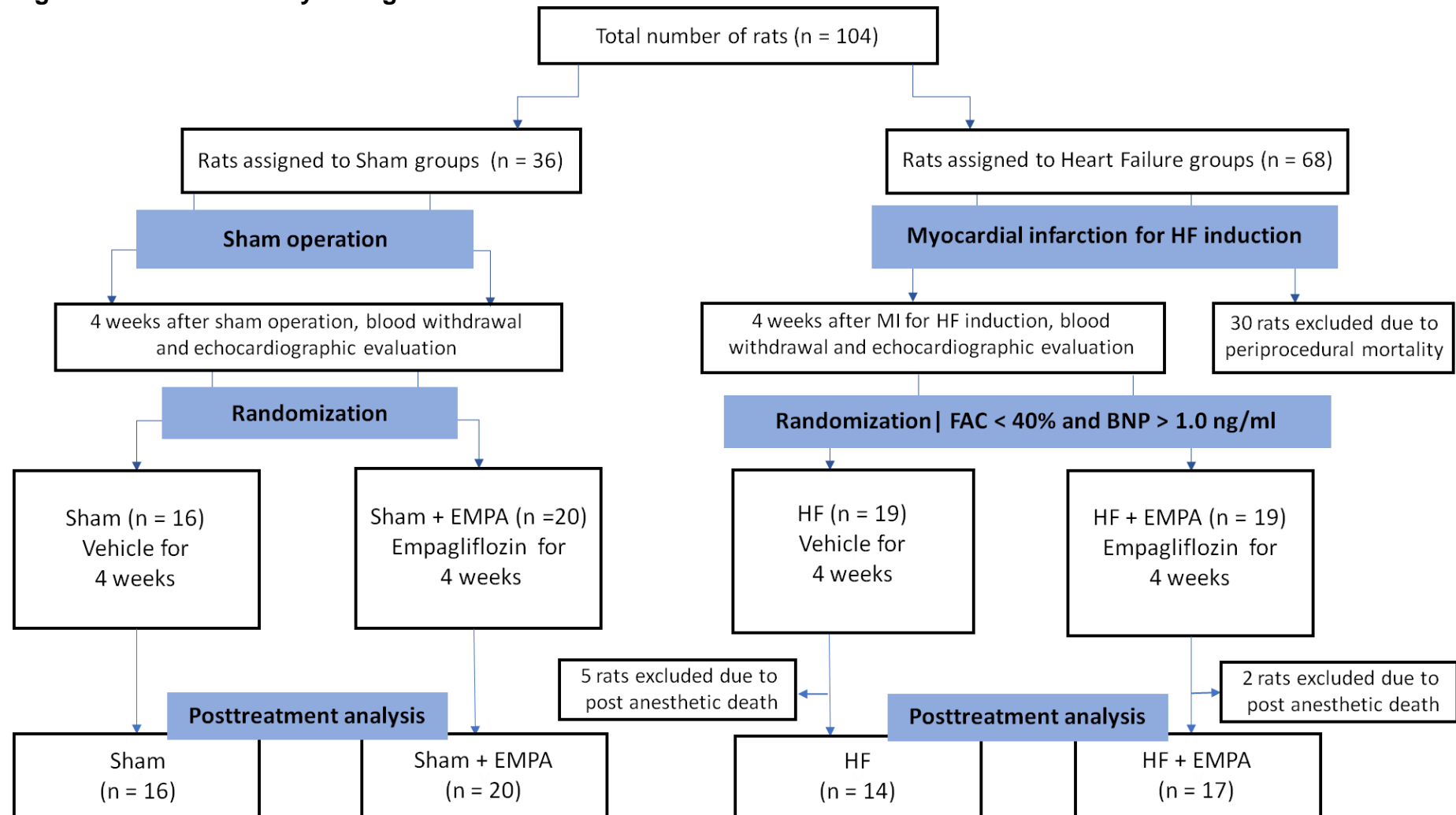


Figure S2. Schematic timeline of the study.

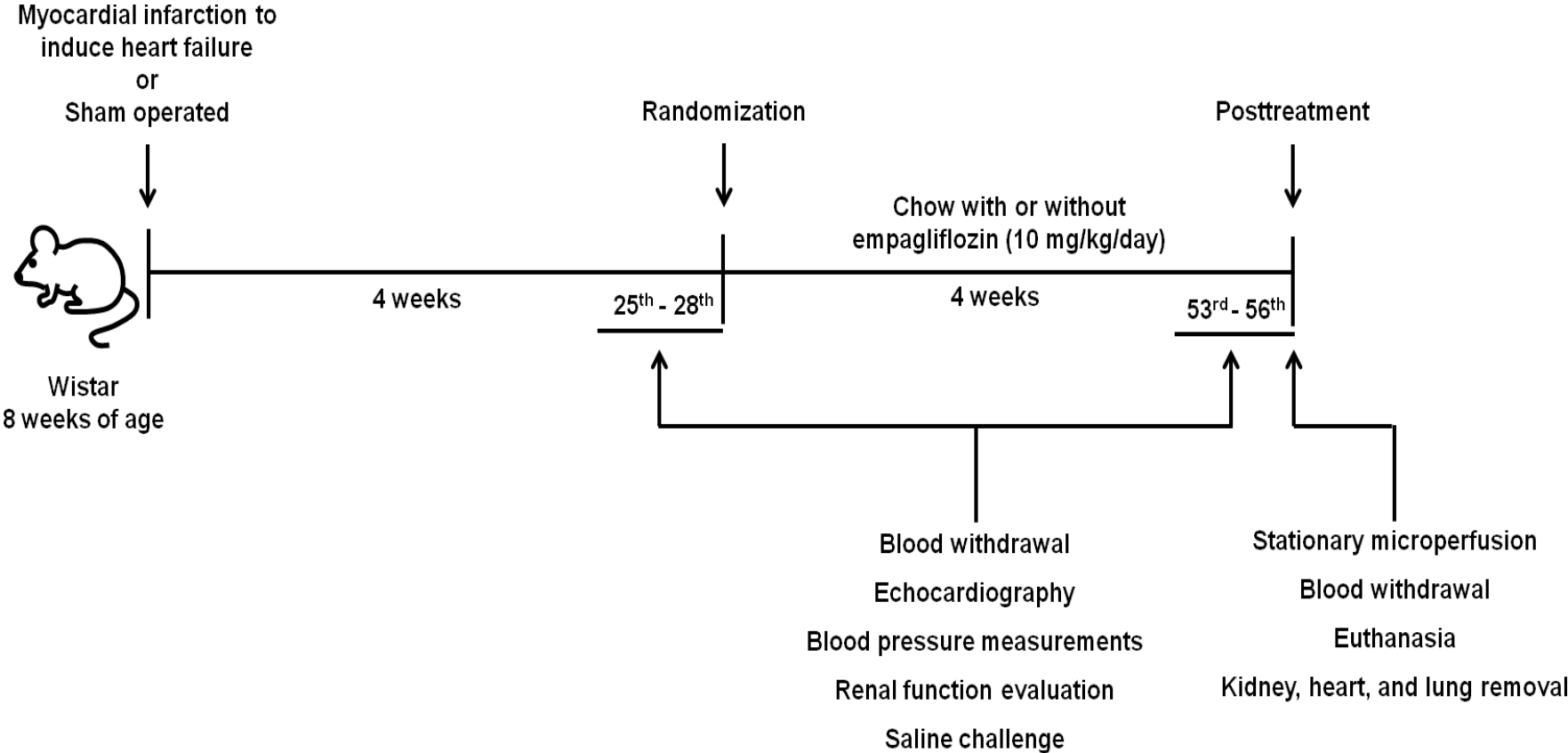


Figure S4.

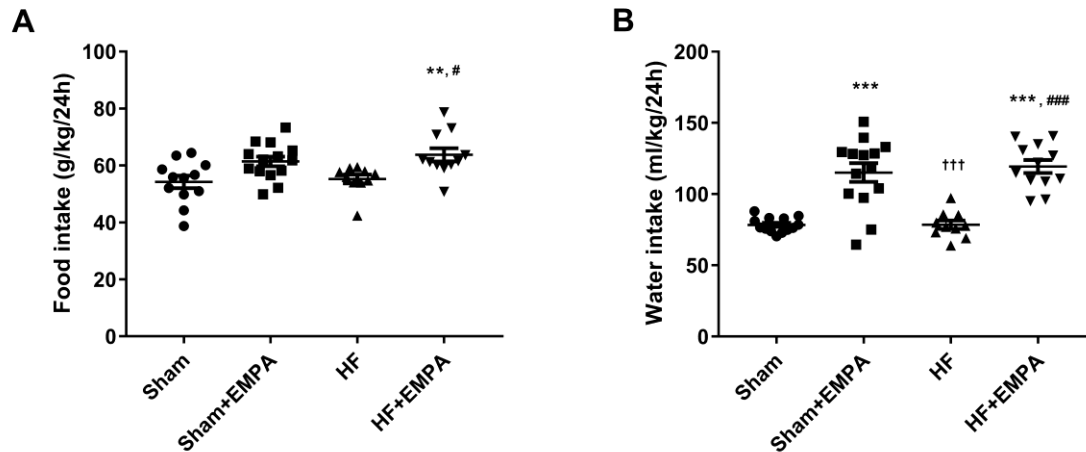
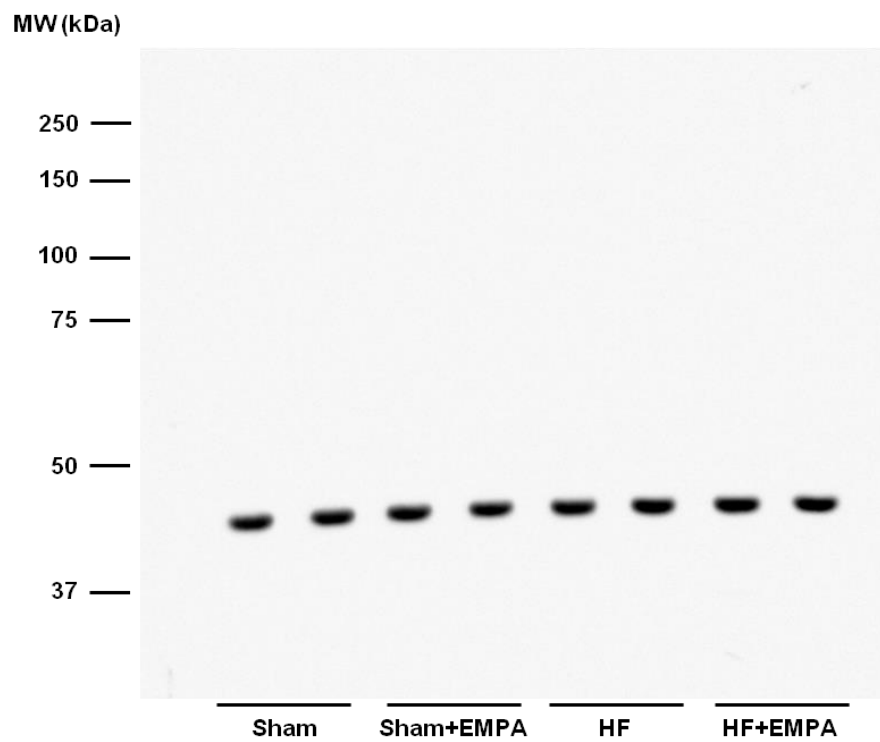
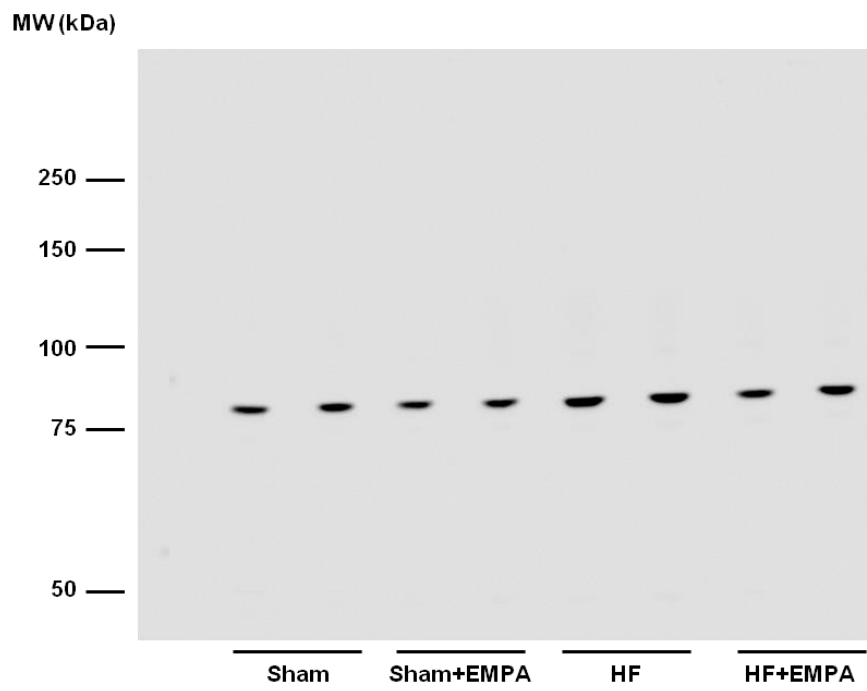
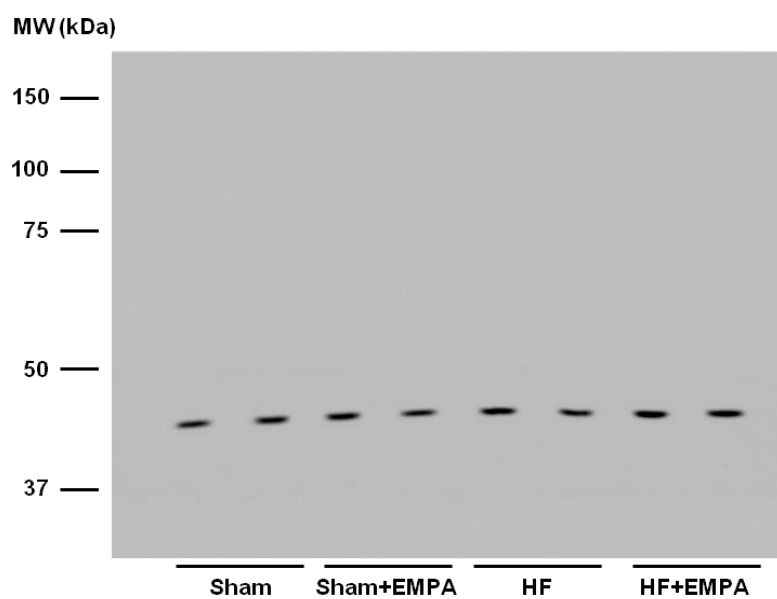
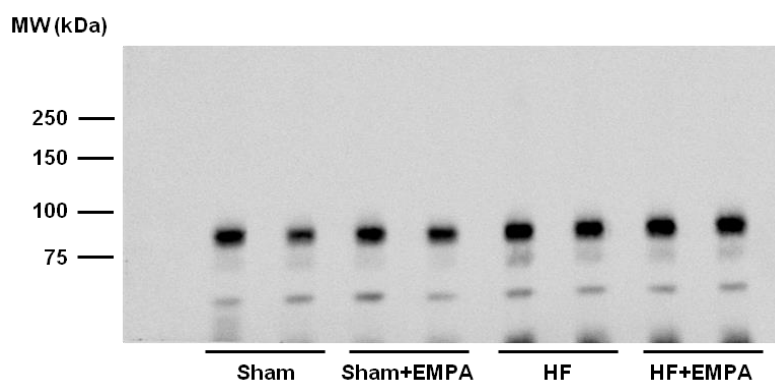
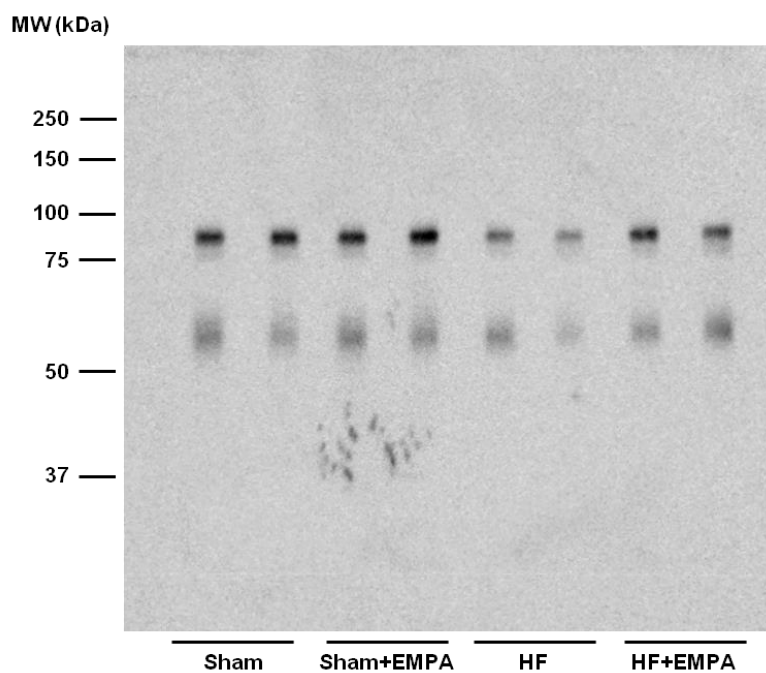


Figure S4. Evaluation of food and water intake. Rats were individually placed into metabolic cages for the 24-h urine collection to measure food and water intake. **(A)** Food intake. **(B)** Water intake. Experiments were performed four weeks after treatment with EMPA or no treatment. The values represent individual measurements and means \pm SEM. **P < 0.01, and ***P < 0.001 vs. Sham; #P < 0.05 and ###P < 0.001 vs. HF; †††P < 0.001 vs. Sham+EMPA.

Full unedited gels for Figure 3.



Full unedited gels for Figure 7.



PERSPECTIVES

Cardioprotection conferred by sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: a renal proximal tubule perspective

Danúbia Silva dos Santos, Juliano Z. Polidoro, Flávio A. Borges-Júnior, and  Adriana C. C. Girardi

Heart Institute (InCor), University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

Submitted 8 July 2019; accepted in final form 11 November 2019

Silva dos Santos D, Polidoro JZ, Borges-Júnior FA, Girardi AC. Cardioprotection conferred by sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: a renal proximal tubule perspective. *Am J Physiol Cell Physiol* 318: C328–C336, 2020. First published November 13, 2019; doi:10.1152/ajpcell.00275.2019.—Sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors, also known as gliflozins, improve glycemia by suppressing glucose reuptake in the renal proximal tubule. Currently, SGLT2 inhibitors are primarily indicated as antidiabetic agents; however, their benefits extend far beyond glucose control. Cardiovascular outcome trials indicated that all studied SGLT2 inhibitors remarkably and consistently reduce cardiovascular mortality and hospitalization for heart failure (HF) in type 2 diabetes (T2D) patients. Nevertheless, the mechanisms underlying the unprecedented cardiovascular benefits of gliflozins remain elusive. Multiple processes that directly or indirectly improve myocardial performance may be involved, including the amelioration of proximal tubular dysfunction. Therefore, this paper provides a perspective on the potential cellular and molecular mechanisms of the proximal tubule that may, at least in part, mediate the cardioprotection conferred by SGLT2 inhibitors. Specifically, we focus on the effects of SGLT2 on extracellular volume homeostasis, including its plausible functional and physical association with the apical Na^+/H^+ exchanger isoform 3 as well as its complex and its possible bidirectional interactions with the intrarenal angiotensin system and renal sympathetic nervous system. We also discuss evidence supporting a potential benefit of gliflozins in reducing cardiovascular risk, attributable to their effect on proximal tubule handling of uric acid and albumin as well as in erythropoietin production. Unraveling the mechanisms behind the beneficial actions of SGLT2 inhibitors may not only contribute to a better understanding of the pathophysiology of cardiovascular diseases but also enable repurposing of gliflozins to improve the routine management of HF patients with or without T2D.

extracellular volume; heart failure; hyperglycemia; intrarenal angiotensin system; Na^+/H^+ exchanger isoform 3; sympathetic nervous system

INTRODUCTION

Sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors, also known as gliflozins, constitute a novel class of oral antidiabetic drugs that specifically inhibit SGLT2 activity in the proximal tubule, thus preventing renal glucose reabsorption (14, 73). As glucose excretion increases, plasma glucose levels decrease,

leading to favorable changes in all glycemic parameters while posing minimal risk of hypoglycemia (73).

The beneficial effects of SGLT2 inhibitors extend beyond glucose control. Empagliflozin showed remarkable reductions in cardiovascular and all-cause mortality and in hospitalization for heart failure (HF) in type 2 diabetes (T2D) patients with established cardiovascular disease (89). These findings were reported in the Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes (EMPA-REG OUTCOME) trial, which was the first study to show a significant reduction in a primary cardiovascular end point with a glucose-lowering agent (89). Similar results were subsequently reported by the Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study program (45) and the Dapagliflozin Effect on Cardiovascular Events study (81), supporting the cardiovascular benefits of gliflozins in patients with T2D. Nevertheless, the mechanisms underlying the cardioprotective effect conferred by inhibition of SGLT2 activity remain largely unknown. Multiple metabolic and hemodynamic processes that directly or indirectly improve myocardial performance might be involved. Intriguingly, although SGLT2 is not expressed in the heart, the gliflozins are able to inhibit the activity of the Na^+/H^+ exchanger isoform 1 (72), which may contribute to attenuate cardiac remodeling and HF progression in patients with T2D (48). In addition, preclinical and clinical studies have shown that SGLT2 inhibitors improve endothelial function and reduce arterial stiffness (77), a well-known predictor of cardiovascular mortality and morbidity. Furthermore, the increased glucagon levels induced by gliflozins may contribute to cardioprotection, since this pancreatic hormone is known to elicit positive inotropic and chronotropic effects in myocardial cells (4). Altogether, these effects combined with the switch of myocardial fuel utilization away from glucose toward ketone bodies, free fatty acid, and branched-chain amino acids (63) suggest a multifactorial multiorgan-beneficial hypothesis for SGLT2 inhibitor-mediated cardioprotection.

The proximal tubule is the nephron segment where virtually all of the filtered glucose is reabsorbed (39). Additionally, the renal proximal tubule is responsible for reabsorbing nearly two-thirds of all filtered sodium, which is predominantly mediated by the apical Na^+/H^+ exchanger isoform 3 (NHE3; see Refs. 31, 33, 64, 82). Moreover, proximal tubule function is affected by and may also affect key mediators of heart-kidney communication, including the renin-angiotensin system (RAS), the sympathetic nervous system (SNS), reactive oxygen species (ROS), and inflammatory molecules. Thus, it is reasonable to postulate that SGLT2 inhibition may attenuate proximal tubular dysfunction in patients with diabetes and/or HF (15,

Address for reprint requests and other correspondence: A. C. C. Girardi, Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44, 10° andar, Bloco II, 05403-900 – São Paulo, SP – Brazil (e-mail: adriana.girardi@incor.usp.br).

74). Here, we discuss the potential cellular and molecular mechanisms of the proximal tubule that underpin the cardiac benefits of SGLT2 inhibitors. Specifically, we focus on the role of SGLT2 on volume homeostasis, including its potential functional and physical association with NHE3 as well as its complex and its possible bidirectional interactions with the neurohumoral systems. The involvement of other mechanisms in the proximal tubule that might contribute to the cardiovascular benefits promoted by gliflozin therapy, including reduction in hyperuricemia and albuminuria and increase in erythropoietin production, is also discussed.

MALADAPTIVE REGULATION OF SGLT2 IN METABOLIC AND CARDIOVASCULAR DISEASES

Under physiological conditions, SGLT2, a low-affinity, high-capacity transporter expressed in the early S1 and S2 segments of the proximal tubule (38, 75), reabsorbs 97% of the filtered glucose (75). The remaining 3% is reabsorbed by SGLT1, a high-affinity, low-capacity transporter present in the late S3 segment (73). The fact that SGLT2 reabsorbs the majority of the filtered glucose, combined with the observation that SGLT2 gene mutations lead to benign glycosuria (familial renal glycosuria), underscore the rationale for the development of SGLT2 inhibitors as effective and safe antidiabetic drugs (73).

The use of SGLT2 inhibitors as a therapeutic tool for glycemic control is also supported by the fact that SGLT2 expression and activity are upregulated in proximal tubular cells as a result of a maladaptive regulatory mechanism that contributes to the maintenance of hyperglycemia (56, 71, 79). The increase in SGLT2 activity in the kidneys in response to diabetes was further confirmed in studies using proximal tubule cell culture models. Umino and colleagues (71) demonstrated that a 24-h treatment of porcine proximal tubule cells with high levels of glucose (to mimic hyperglycemia) at the basolateral side upregulated SGLT2 expression via GLUT2-mediated signal transduction. High-glucose treatment at the apical side also enhanced SGLT2 expression; however, this upregulation seemed to occur after longer incubation periods, i.e., 72 and 96 h for transcript upregulation and 120 h for protein upregulation (37). Interestingly, Nakamura et al. (42) showed that supra-physiological concentrations of insulin upregulate SGLT2 protein expression and activity via ROS generation in human cultured proximal tubule cells. Of note, these authors did not observe any effects of hyperglycemia on SGLT2 expression, which may have resulted from treatment with high glucose concentrations at the luminal side for only 24 h.

In addition to hyperglycemia and hyperinsulinemia, the hyperactivation of the SNS and/or RAS may also be involved in the upregulation of SGLT2 expression under pathological conditions. Matthews et al. (40) showed that supraphysiological concentrations of norepinephrine upregulate SGLT2 expression and the translocation of SGLT2 to the apical membrane of human proximal tubule cells. The role of the SNS in SGLT2 overexpression was also demonstrated in cultured human proximal tubular HK2 cells, and treatment with norepinephrine further increased SGLT2 gene expression in cells exposed to high-glucose conditions (55). Osorio and colleagues (46) reported that angiotensin II type 1 receptor (AT₁R) blockade decreases SGLT2 expression in hypertensive diabetic rats, suggesting that angiotensin II (ANG II) upregulates SGLT2

expression. Accordingly, SGLT2 upregulation by ANG II was also observed in nondiabetic settings, such as in renovascular hypertensive rats, in which sodium-dependent glucose uptake was increased and accompanied by increased expression of the SGLT2 protein and transcript in the renal proximal tubule (3). When these rats, which had secondary hypertension, were treated with the angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor ramipril or the AT₁R blocker losartan, the increases in both blood pressure and the activity/expression of SGLT2 were prevented (3). Furthermore, enhancement of SGLT2 gene expression has also been observed in the renal cortex of rats with ANG II-induced hypertension (59).

It is worth mentioning that hyperglycemia may lead to RAS activation in the proximal tubule (78, 88) and thus to the generation of a vicious cycle of SGLT2 upregulation and intrarenal RAS hyperactivation that may contribute to the progression of not only T2D but also cardiovascular diseases, including hypertension and HF. It remains to be determined whether SGLT2 expression and proximal tubule glucose uptake are upregulated in essential hypertension or HF that is not primarily associated with T2D and is characterized by intrarenal RAS hyperactivation (44, 65).

SGLT2 inhibition causes a persistent 7% reduction in the plasma volume in diabetic patients, which is associated with reductions in body weight and in systolic and diastolic blood pressure that are observed in this population (22, 26, 58). Interestingly, mice lacking SGLT2 do not display volume depletion, as suggested by similar body weight, blood pressure, and hematocrit compared with wild-type mice (75). On the other hand, selective deletion of the *Nhe3* gene in the proximal tubule significantly increases urinary sodium excretion and decreases systolic and diastolic arterial pressure in both adult male and female mice (33). Notably, proximal tubule-specific NHE3 knockout mice display upregulation of other sodium transporter protein expression, including SGLT2. Nonetheless, these adaptive mechanisms are unable to restore extracellular fluid balance and blood pressure homeostasis in these mice (33). Moreover, by coupling a mathematical model of renal function and volume homeostasis with clinical data, Hallow and colleagues predicted that NHE3 inhibition is a required mechanism for the gliflozin-induced natriuretic effect (18). Indeed, their simulation suggests that the compensatory increase in SGLT1-mediated transport during SGLT2 inhibitor treatment is fully capable of counteracting sodium loss if gliflozins directly induced only SGLT2-mediated sodium reabsorption and osmotic diuresis (18). Thus, one may postulate that the mechanisms by which SGLT2 inhibition mediates blood volume contraction may be the result of a reduction in tubular sodium reabsorption through the inhibition of proximal tubule NHE3-mediated sodium reabsorption.

ROLE OF SGLT2 IN VOLEMIC HOMEOSTASIS: THE POTENTIAL FUNCTIONAL AND PHYSICAL INTERACTION BETWEEN SGLT2 AND NHE3

The first evidence that SGLT2 and NHE3 may functionally and physically interact was provided by our research group (51). We found that the systemic administration of the nonspecific SGLT competitive inhibitor phlorizin markedly increased urinary Na⁺ and HCO₃⁻ excretion. These findings are in accordance with data from the in vivo stationary microperfusion

of the proximal tubule, in which the addition of phlorizin to the luminal fluid acutely reduces NHE3 activity, even in the absence of glucose. Such evidence rules out the possibility that the effect of SGLT inhibition could simply be mediated by an osmotic diuretic mechanism induced by luminal glucose. Moreover, through immunofluorescence experiments, we showed that SGLT2, but not SGLT1, colocalized with NHE3 in the apical membrane of the renal proximal tubule (51).

Importantly, the upregulation of NHE3 expression and activity in the renal proximal tubule has been implicated in the pathogenesis of HF, including fluid retention and peripheral edema (15, 24). Using experimental models of HF, we and others have demonstrated that the activity of NHE3 is increased in the proximal tubule of rats with HF and is accompanied by enhanced renal cortical NHE3 mRNA and protein expression. Upregulated function and expression of NHE3 in HF seems to be driven by ANG II since it has been demonstrated that elevated NHE3 and salt handling are normalized in HF rats treated with AT₁R blockers (35, 67).

Increasing evidence indicates that NHE3 activity in the renal proximal tubule is regulated by several hormones and compounds associated with glucose metabolism and glucose disorders, including diabetes. The upregulation of proximal tubule NHE3 activity and expression has been documented in rats with streptozotocin-induced diabetes (19, 28) and in studies using proximal tubule cell lines that were exposed to high glucose concentrations (60). Additionally, Fuster et al. (13) showed that supraphysiological concentrations of insulin acutely and chronically stimulate NHE3 activity. Moreover, antidiabetic agents, including dipeptidyl peptidase IV inhibitors (16, 47) and glucagon-like peptide-1 receptor agonists (5, 9), reduce NHE3 function. Our recent finding that endogenous glucagon-like peptide-1 exerts a tonic effect on renal sodium balance, in part via NHE3 inhibition, supports the existence of a relationship between glycemic and extracellular volume homeostasis (12). Notably, glucose entry mediated by SGLT1 in intestinal cells is well known to induce NHE3 activation by an AKT-dependent signaling pathway (34). Changes in luminal glucose concentration also influence NHE3 function in the renal proximal tubule (43, 51), but the mechanisms underlying this regulatory process have yet to be defined.

The finding that NHE3 and SGLT2 colocalize in the apical membrane of the proximal tubule supports the hypothesis that these two transporters may physically interact (51). In addition, evidence from the literature suggests the existence of a multimeric protein complex comprising these two transporters, the scaffold protein PDZ domain containing 1 (PDZK1) and 17-kDa membrane-associated protein (MAP17; see Refs. 8, 54, and 69) in the renal proximal tubule. More specifically, Coady and colleagues found that the MAP17 protein directly interacts with SGLT2 and that such interaction is essential to SGLT2 transport function (8). The MAP17 protein interacts with PDZK1 (54), which in turn directly associates with NHE3 (Ref. 68 and Fig. 1).

Additional research efforts are clearly warranted to validate the hypothesis that SGLT2 interacts with NHE3 under physiological and pathophysiological conditions. It also remains to be established whether SGLT2 inhibitors are capable of downregulating overactive NHE3 in T2D and HF, thereby contributing to the improvement of salt handling in hypervolemia, hyperglycemia, and/or insulin resistance (Fig. 1). Experimental

validation of the existence of a functional and possibly physical interaction between NHE3 and SGLT2 represents a significant advance in our understanding of the signaling pathways responsible for the simultaneous regulation (or dysregulation) of glucose and extracellular fluid volume homeostasis.

CARDIOPROTECTION INDUCED BY NEUROHUMORAL MECHANISMS IN THE PROXIMAL TUBULE AFTER SGLT2 INHIBITION

The chronic hyperactivation of neurohumoral mediators, such as the RAS and the SNS, is often associated with oxidative stress and inflammation, which contribute to the development and progression of several conditions that affect both the cardiovascular and renal systems, including HF (32) and T2D (23). The renal proximal tubule expresses all classic RAS components (41), is densely innervated by afferent and efferent sympathetic nerves (2, 76), and produces several chemokines and cytokines as well as ROS (10, 80).

Intrarenal RAS suppression has been demonstrated in response to SGLT2 inhibition in experimental models of T2D (66, 83) and may, therefore, contribute to the reduction in cardiovascular complications in patients affected by this disease. The coordinated inhibition of SGLT2 and NHE3 may also occur through a reduction in intrarenal RAS activity (3, 17, 57) in response to gliflozins, thus preventing NHE3 upregulation and salt retention. Notwithstanding, SGLT2 inhibitor-mediated volume reduction induces plasma renin secretion (1), and the subsequent production of systemic ANG II could upregulate angiotensinogen (AGT) in the proximal tubule via a positive feedback mechanism. In this regard, Cherney and colleagues (6) found that an 8-wk treatment with empagliflozin increases urinary AGT, which is considered a marker of intrarenal RAS activity, the ACE2 protein level and activity, and ACE levels in type 1 diabetes (T1D) patients during clamped euglycemia. The effects of SGLT2 inhibitors on urinary AGT levels have also been evaluated in a small-scale clinical study with T2D patients (87). These authors found that the administration of SGLT2 inhibitors in combination with other antidiabetic drugs for 1 mo decreased hemoglobin A_{1c}, body weight, and systolic and diastolic blood pressure, which was accompanied by a trend toward a reduction in the urinary intact AGT-to-creatinine ratio ($P = 0.08$) compared with that at baseline. Therefore, two different factors that oppositely influence intrarenal RAS, i.e., volume reduction and hyperglycemia reduction, seem to be altered in response to SGLT2 inhibitors, and the net effect may depend on the magnitude of the changes in each of these parameters after drug treatment. Further long-term large-sample-size studies are required to determine the role of intrarenal RAS suppression in SGLT2-induced cardiorenal protection in human disease.

Proximal tubule sympathetic hyperactivity is associated with disturbances in the renal handling of glucose, sodium, and water (11, 40, 61). It is known that the renal sympathetic denervation of uninephrectomized diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats improves glucose metabolism and insulin resistance, which is associated with the augmentation of urinary glucose excretion by the suppression of SGLT2 overexpression (55). In turn, dapagliflozin lowers renal and heart sympathetic nerve activities in high-fat diet-fed mice (40). Because an increase in renal efferent activity leads to a sym-

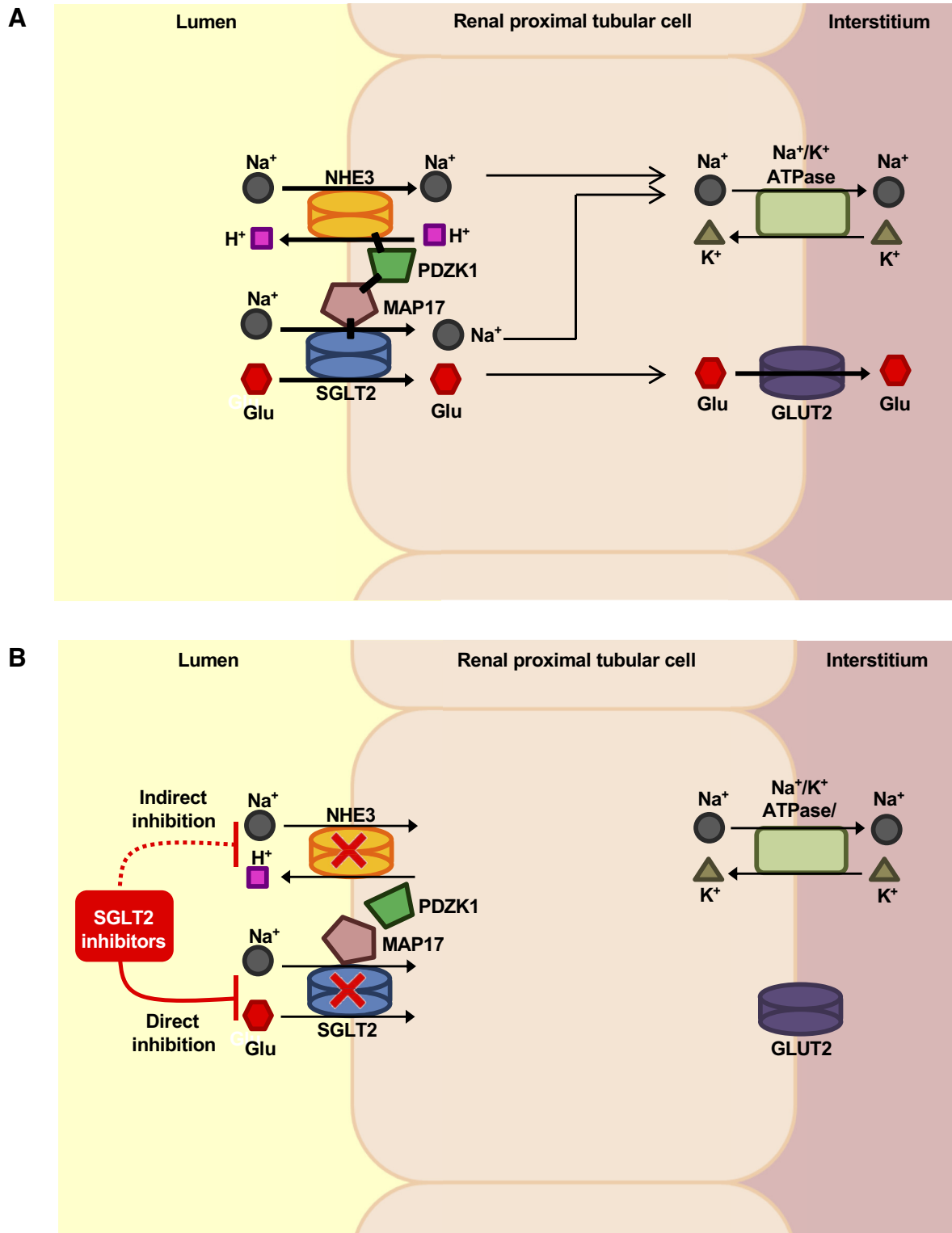


Fig. 1. Schematic diagram illustrating the hypothetical functional and physical association between sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) and Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 (NHE3) in the renal proximal tubule. *A* and *B*: proximal tubular cells of the S1 and S2 segments express SGLT2 and NHE3 on the apical membrane and GLUT2 and Na⁺-K⁺-ATPase on the basolateral membrane. Glucose reabsorption occurs first via glucose transport across the apical membrane via SGLT2 and then by passive glucose exit toward the interstitium via GLUT2. NHE3 is the principal apical membrane pathway for the reabsorption of sodium, whereas Na⁺-K⁺-ATPase is primarily responsible for moving sodium from the cell to the interstitium. The scaffold proteins PDZ domain containing 1 (PDZK1) and 17-kDa membrane-associated protein (MAP17) may link NHE3 to SGLT2, and this multiprotein complex may constitute an important functional unit that allows the concomitant regulation of extracellular volume and glucose homeostasis. Disruption of this multiprotein complex by SGLT2 inhibitors (*B*) may be the molecular mechanism underlying gliflozin-mediated NHE3 downregulation. This model requires further experimental validation.

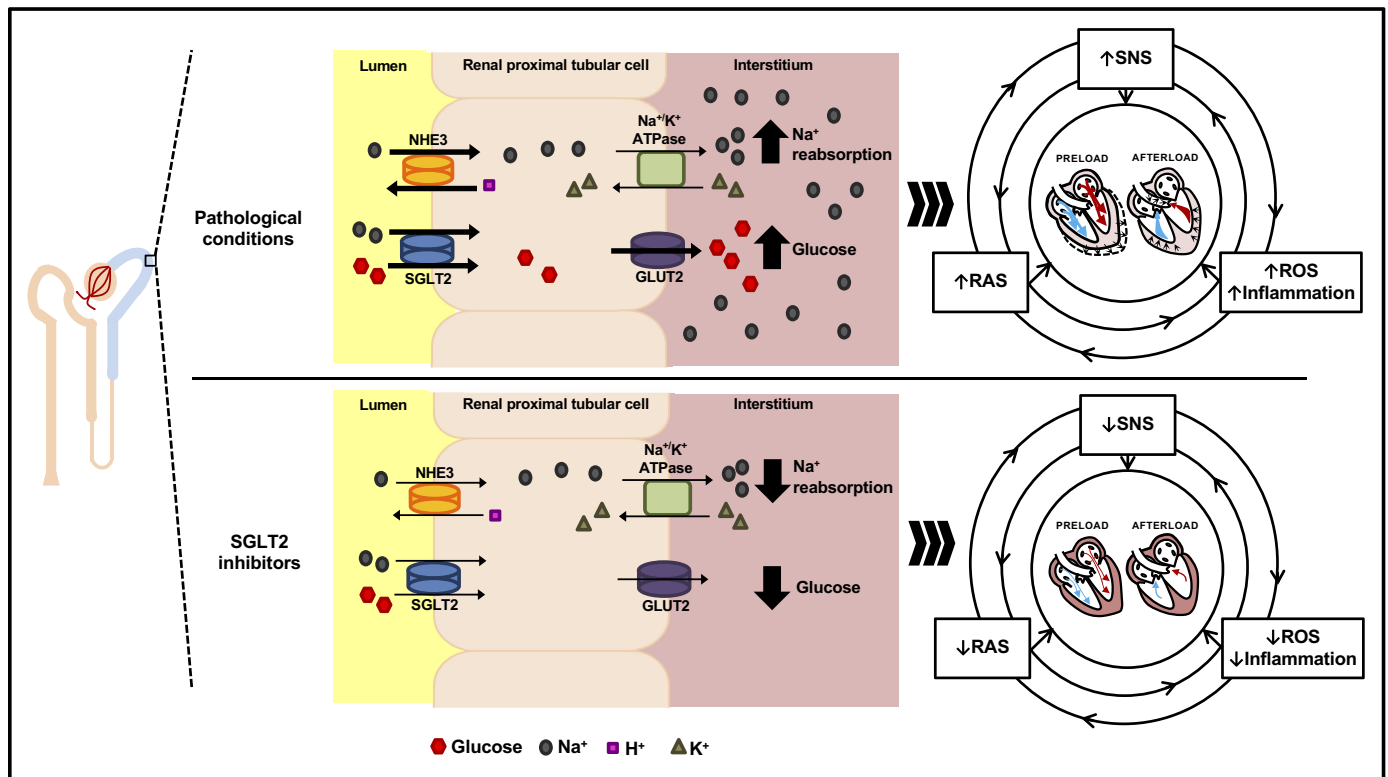


Fig. 2. Hypothetical scheme illustrating the potential role of the proximal tubule in mediating the cardioprotection conferred by sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors. *Top*: Na^+/H^+ exchanger isoform 3 (NHE3) and SGLT2 expression and activity are upregulated on the apical membrane of proximal tubules in type 2 diabetes (T2D), renovascular hypertension, and plausibly in heart failure (HF). As a consequence, there is an increase in sodium and glucose uptake, which cross the basolateral membrane via Na^+/K^+ -ATPase and GLUT2, respectively. Sustained hyperglycemia recruits certain interconnected physiological processes, namely, the renin-angiotensin system (RAS) and the sympathetic nervous system (SNS), as well as reactive oxygen species (ROS) production and inflammation in the proximal tubule. Collectively, SGLT2 and NHE3 upregulation and the hyperactivation of these different regulatory systems in the proximal tubule may result in cardiac impairment by means of salt retention and activation of the SNS renoreflex with a consequent increase in cardiac preload and afterload. *Bottom*: SGLT2 inhibitors not only downregulate SGLT2 but also may decrease sodium uptake by NHE3, thus lowering the reabsorption of sodium and glucose, with consequent improvement of fluid retention and glycemia. The localized blockade of glucose uptake by proximal tubular cells may also downregulate RAS, SNS, and inflammatory/oxidative mediators. Therefore, by improving glycemia, promoting plasma volume contraction, lowering blood pressure, and adjusting proximal tubular neurohumoral dysfunction, SGLT2 inhibitors would play an essential role in the reduction in cardiac preload (blue and red thinner arrows during diastole) and afterload (lack of tiny black arrows in ascending aorta), ultimately leading to an improved cardiac workload with a decrease in cardiac power required to prompt stroke volume (blue and red thinner arrows during systole) and enhancement of cardiac perfusion (dark red versus light red in cardiac wall).

pathoexcitatory renoreflex mechanism in different pathological conditions, such as diabetes, hypertension, and HF (29), it is plausible that gliflozins may indirectly exert cardiac sympathetic inhibition and therefore confer cardioprotection by modulating renal afferences. The underlying mechanism of SGLT2 inhibitor-mediated sympathetic reduction remains unclear and needs to be further addressed. Rats treated with ipragliflozin, but not insulin, display sympathoinhibition, despite having similar plasma glucose levels (86). Thus, rather than systemic glucose control, the localized blockade of glucose uptake in the proximal tubule might be the underlying mechanism that leads to an inhibition in renal sympathetic activity. The stimulation of renal sympathetic innervations is also associated with an increase in NHE3 activity in the apical membrane of the proximal tubule and is accompanied by antinatriuretic and antidiuretic responses (21, 53). Hence, the attenuation of the sympathetic hyperactivity of renal efferences and afferences by gliflozins may also improve volemia in T2D associated with cardiovascular diseases by reducing overactive NHE3.

SGLT2 inhibition can also improve the proximal tubule inflammatory and oxidative stress status (20, 49, 84). Hyper-

glycemia and ANG II stimuli can trigger inflammatory responses and ROS production in human proximal tubule cells, and both of these effects are prevented by gliflozin treatment (20, 49). SGLT2 inhibition by dapagliflozin also downregulates the expression of renal inflammatory genes and reduces renal oxidative stress in the kidneys of Akita mice, an experimental model of T1D, to a greater extent than insulin (20). Therefore, not only improvement of hyperglycemia but also direct inhibition of SGLT2-mediated proximal tubule glucose uptake by gliflozins contribute to the attenuation of renal inflammation and oxidative stress and, consequently, to the amelioration of cardiorenal dysfunction.

OTHER MECHANISMS IN THE PROXIMAL TUBULE THAT MIGHT CONTRIBUTE TO THE CARDIOPROTECTION CONFERRED BY SGLT2 INHIBITORS

On the basis of an explanatory post hoc analysis from the EMPA-REG OUTCOME trial, Inzucchi and colleagues (25) estimated that changes in hematocrit (and hemoglobin) mediate ~50% of the effect of this SGLT2 inhibitor on reducing the risk

of cardiovascular death in T2D patients. A smaller contribution of other potential mediators was also identified, including improvements in albuminuria, serum uric acid concentrations, and chronic management of blood glucose levels (25). Notably, the actions of gliflozins on the proximal tubule cell may play a part in ameliorating all of these physiological parameters.

SGLT2 inhibitor therapy is associated with a modest increase in hematocrit (89). The elevation in hematocrit reflects hemoconcentration resulting from plasma volume reduction due to the natriuretic effects of gliflozins. Additionally, clinical observations suggest that the increase in hematocrit associated with gliflozin therapy may also be because of increased erythropoietin production (30). The proposed mechanism by which SGLT2 inhibitors increase erythropoietin production in T2D involves alleviation of metabolic stress on the proximal tubule cell. This leads to improved hypoxia and inflammation in the microenvironment around the proximal tubules, which in turn allows the reversion of myofibroblasts to erythropoietin-producing fibroblasts (62).

Albuminuria is a strong and independent indicator of cardiovascular risk among individuals with and without T2D. A meta-analysis based on the data from 15 randomized clinical trials (17,540 individuals) demonstrated that SGLT2 inhibitors reduce albuminuria levels by 25% compared with placebo or other antidiabetic agents (52). Albuminuria can be either due to damage of the glomerular barrier and/or impairment of proximal tubular protein uptake via receptor-mediated endocytosis. Interestingly, an *in vitro* study has shown that luminal, but not basolateral, hyperglycemia reduces megalin-mediated albumin endocytosis in proximal tubule cells (50). Thus, it is possible that, by preventing glucose from entering proximal tubule cells, SGLT2 inhibitors may reduce proximal tubular albuminuria during T2D. SGLT2 inhibitors also lower glomerular hyperfiltration and glomerular albumin permeability, effects that might occur at least in part by tubuloglomerular feedback, as a consequence of reduced proximal tubular sodium reabsorption and increased sodium distal delivery to the macula densa (27, 70).

Hyperuricemia is associated with metabolic abnormalities, cardiovascular disease, and kidney injury (36). The deleterious effects of uric acid are mainly mediated by the activation of intrarenal RAS and inflammatory pathways as well as by increased ROS production (36). Growing evidence has emerged indicating that SGLT2 inhibitors lower serum uric acid levels. The mechanism by which SGLT2 inhibitors lower serum uric acid levels possibly involves the SLC2A9 (GLUT9) transporter, which exchanges glucose for uric acid. Increasing the glucose concentration along the renal tubule in response to gliflozins may lead to an increase in the exchange of luminal glucose for intracellular uric acid via the apical GLUT9 transporter in the renal proximal tubule and collecting ducts (7). This would result in increased excretion of uric acid in the urine and therefore serum uric acid reduction.

CONCLUSION

The proximal tubule plays a key role in the interaction between the heart and kidneys, preserving glycemic and extracellular volume homeostasis. SGLT2 inhibitors lower blood glucose levels by suppressing glucose uptake in the early proximal tubule and lower salt reabsorption, at least in part, by

disrupting a functional interaction between SGLT2 and NHE3. NHE3 downregulation by SGLT2 inhibitors could prevent salt retention, extracellular volume expansion, and blood pressure increases. Moreover, current evidence suggests that SGLT2 inhibition modulates the interconnected neurohumoral systems in the renal proximal tubule (the RAS, SNS, and inflammatory mediators) that cause cardiac impairment through salt retention and the activation of the SNS renoreflex, which result in cardiac sympathetic outflow. By improving glycemia, promoting plasma volume reductions, and reversing proximal tubular neurohumoral dysfunction, the gliflozin class of antidiabetic drugs plays a pivotal role in reducing cardiac preload and ameliorating cardiac afterload, ultimately leading to improved cardiac perfusion (Fig. 2). Currently, gliflozins have challenged traditional algorithms for T2D treatment (85), since recent guidelines consider these drugs to be one of the most important tools for reducing cardiovascular death and HF hospitalization. Notably, the potential role of SGLT2 inhibitors in reducing the burden of cardiorenal complications outside of diabetes is currently being investigated and may also impact future algorithms for the management of HF that is not primarily related to hyperglycemia.

GRANTS

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grant 2016/22140-7.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

D.S.d.S. prepared figures; D.S.d.S., J.Z.P., F.A.B.-J., and A.C.C.G. drafted manuscript; D.S.d.S., J.Z.P., F.A.B.-J., and A.C.C.G. edited and revised manuscript; D.S.d.S., J.Z.P., F.A.B.-J., and A.C.C.G. approved final version of manuscript.

REFERENCES

1. Ansary TM, Nakano D, Nishiyama A. Diuretic effects of sodium glucose cotransporter 2 inhibitors and their influence on the renin-angiotensin system. *Int J Mol Sci* 20: 629, 2019. doi:10.3390/ijms20030629.
2. Barajas L, Powers K, Wang P. Innervation of the renal cortical tubules: a quantitative study. *Am J Physiol* 247: F50–F60, 1984. doi:10.1152/ajprenal.1984.247.1.F50.
3. Bautista R, Manning R, Martinez F, Avila-Casado MC, Soto V, Medina A, Escalante B. Angiotensin II-dependent increased expression of Na⁺-glucose cotransporter in hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F127–F133, 2004. doi:10.1152/ajprenal.00113.2003.
4. Bonner C, Kerr-Conte J, Gmyr V, Queniat G, Moerman E, Thévenet J, Beaucamps C, Delalleau N, Popescu I, Malaisse WJ, Sener A, Deprez B, Abderrahmani A, Staels B, Pattou F. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nat Med* 21: 512–517, 2015. doi:10.1038/nm.3828.
5. Carraro-Lacroix LR, Malnic G, Girardi ACC. Regulation of Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by glucagon-like peptide 1 receptor agonist exendin-4 in renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F1647–F1655, 2009. doi:10.1152/ajprenal.00082.2009.
6. Cherney DZ, Perkins BA, Soleymanlou N, Xiao F, Zimpelmann J, Woerle HJ, Johansen OE, Broedl UC, von Eynatten M, Burns KD. Sodium glucose cotransport-2 inhibition and intrarenal RAS activity in people with type 1 diabetes. *Kidney Int* 86: 1057–1058, 2014. doi:10.1038/ki.2014.246.
7. Chino Y, Samukawa Y, Sakai S, Nakai Y, Yamaguchi J, Nakanishi T, Tamai I. SGLT2 inhibitor lowers serum uric acid through alteration of uric acid transport activity in renal tubule by increased glycosuria. *Biopharm Drug Dispos* 35: 391–404, 2014. doi:10.1002/bdd.1909.
8. Coady MJ, El Tarazi A, Santer R, Bissonnette P, Sasseville LJ, Calado J, Lussier Y, Dumayne C, Bichet DG, Lapointe JY. MAP17 is a

- necessary activator of renal Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. *J Am Soc Nephrol* 28 85–93, 2017. doi:10.1681/ASN.2015111282.
9. Crajinas RO, Oricchio FT, Pessoa TD, Pacheco BPM, Lessa LMA, Malnic G, Girardi ACC. Mechanisms mediating the diuretic and natriuretic actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 301: F355–F363, 2011. doi:10.1152/ajprenal.00729.2010.
 10. Dhande I, Ali Q, Hussain T. Proximal tubule angiotensin AT2 receptors mediate an anti-inflammatory response via interleukin-10: role in renoprotection in obese rats. *Hypertension* 61: 1218–1226, 2013. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00422.
 11. DiBona GF. Sympathetic nervous system and the kidney in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11: 197–200, 2002. doi:10.1097/00041552-200203000-00011.
 12. Farah LX, Valentini V, Pessoa TD, Malnic G, McDonough AA, Girardi AC. The physiological role of glucagon-like peptide-1 in the regulation of renal function. *Am J Physiol Renal Physiol* 310: F123–F127, 2016. doi:10.1152/ajprenal.00394.2015.
 13. Fuster DG, Bobulescu IA, Zhang J, Wade J, Moe OW. Characterization of the regulation of renal Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 by insulin. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F577–F585, 2007. doi:10.1152/ajprenal.00240.2006.
 14. Ghezzi C, Yu AS, Hirayama BA, Kepe V, Liu J, Scafoglio C, Powell DR, Huang SC, Satyamurthy N, Barrio JR, Wright EM. Dapagliflozin binds specifically to sodium-glucose cotransporter 2 in the proximal renal tubule. *J Am Soc Nephrol* 28: 802–810, 2017. doi:10.1681/ASN.2016050510.
 15. Girardi ACC, Di Sole F. Deciphering the mechanisms of the Na⁺/H⁺ exchanger-3 regulation in organ dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 302: C1569–C1587, 2012. doi:10.1152/ajpcell.00017.2012.
 16. Girardi ACC, Knauf F, Demuth HU, Aronson PS. Role of dipeptidyl peptidase IV in regulating activity of Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in proximal tubule cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C1238–C1245, 2004. doi:10.1152/ajpcell.00186.2004.
 17. Gurley SB, Riquier-Brisson ADM, Schnermann J, Sparks MA, Allen AM, Haase VH, Snouwaert JN, Le TH, McDonough AA, Koller BH, Coffman TM. AT1A angiotensin receptors in the renal proximal tubule regulate blood pressure. *Cell Metab* 13: 469–475, 2011. doi:10.1016/j.cmet.2011.03.001.
 18. Hallow KM, Greasley PJ, Helmlinger G, Chu L, Heerspink HJ, Boulton DW. Evaluation of renal and cardiovascular protection mechanisms of SGLT2 inhibitors: model-based analysis of clinical data. *Am J Physiol Renal Physiol* 315: F1295–F1306, 2018. doi:10.1152/ajprenal.00202.2018.
 19. Harris RC, Brenner BM, Seifter JL. Sodium-hydrogen exchange and glucose transport in renal microvillus membrane vesicles from rats with diabetes mellitus. *J Clin Invest* 77: 724–733, 1986. doi:10.1172/JCI112367.
 20. Hatanaka T, Ogawa D, Tachibana H, Eguchi J, Inoue T, Yamada H, Takei K, Makino H, Wada J. Inhibition of SGLT2 alleviates diabetic nephropathy by suppressing high glucose-induced oxidative stress in type 1 diabetic mice. *Pharmacol Res Perspect* 4: e00239, 2016. doi:10.1002/prp2.239.
 21. Healy V, Thompson C, Johns EJ. The adrenergic regulation of proximal tubular Na⁺/H⁺ exchanger 3 in the rat. *Acta Physiol (Oxf)* 210: 678–689, 2014. doi:10.1111/apha.12181.
 22. Heerspink HJL, Kosiborod M, Inzucchi SE, Cherney DZI. Renoprotective effects of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors. *Kidney Int* 94: 26–39, 2018. doi:10.1016/j.kint.2017.12.027.
 23. Huggett RJ, Scott EM, Gilbey SG, Stoker JB, Mackintosh AF, Mary DA. Impact of type 2 diabetes mellitus on sympathetic neural mechanisms in hypertension. *Circulation* 108: 3097–3101, 2003. doi:10.1161/01.CIR.0000103123.66264.FE.
 24. Inoue BH, dos Santos L, Pessoa TD, Antonio EL, Pacheco BPM, Savignano FA, Carraro-Lacroix LR, Tucci PJF, Malnic G, Girardi ACC. Increased NHE3 abundance and transport activity in renal proximal tubule of rats with heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: R166–R174, 2012. doi:10.1152/ajpregu.00127.2011.
 25. Inzucchi SE, Zinman B, Fitchett D, Wanner C, Ferrannini E, Schumacher M, Schmoor C, Ohneberg K, Johansen OE, George JT, Hantel S, Bluhmki E, Lachin JM. How does empagliflozin reduce cardiovascular mortality? insights from a mediation analysis of the EMPA-REG OUTCOME trial. *Diabetes Care* 41: 356–363, 2018. doi:10.2337/dc17-1096.
 26. Kawanami D, Matoba K, Takeda Y, Nagai Y, Akamine T, Yokota T, Sango K, Utsunomiya K. SGLT2 inhibitors as a therapeutic option for diabetic nephropathy. *Int J Mol Sci* 18: 1083, 2017. doi:10.3390/ijms18051083.
 27. Kidokoro K, Cherney DZI, Bozovic A, Nagasu H, Satoh M, Kanda E, Sasaki T, Kashihara N. Evaluation of glomerular hemodynamic function by empagliflozin in diabetic mice using in vivo imaging. *Circulation* 140: 303–315, 2019. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037418.
 28. Klisic J, Nief V, Reyes L, Ambuhl PM. Acute and chronic regulation of the renal Na/H⁺ exchanger NHE3 in rats with STZ-induced diabetes mellitus. *Nephron, Physiol* 102: 27–35, 2006. doi:10.1159/000089091.
 29. Kopp UC. Role of renal sensory nerves in physiological and pathophysiological conditions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 308: R79–R95, 2015. doi:10.1152/ajpregu.00351.2014.
 30. Lambers Heerspink HJ, de Zeeuw D, Wie L, Leslie B, List J. Dapagliflozin a glucose-regulating drug with diuretic properties in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 15: 853–862, 2013. doi:10.1111/dom.12127.
 31. Ledoussal C, Lorenz JN, Nieman ML, Soleimani M, Schultheis PJ, Shull GE. Renal salt wasting in mice lacking NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger but not in mice lacking NHE2. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F718–F727, 2001. doi:10.1152/ajprenal.2001.281.4.F718.
 32. Leimbach WN Jr, Wallin BG, Victor RG, Aylward PE, Sundlöf G, Mark AL. Direct evidence from intraneural recordings for increased central sympathetic outflow in patients with heart failure. *Circulation* 73: 913–919, 1986. doi:10.1161/01.CIR.73.5.913.
 33. Li XC, Soleimani M, Zhu D, Rubera I, Tauc M, Zheng X, Zhang J, Chen X, Zhuo JL. Proximal tubule-specific deletion of the NHE3 (Na⁺/H⁺ exchanger 3) promotes the pressure-natriuresis response and lowers blood pressure in mice. *Hypertension* 72: 1328–1336, 2018. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.10884.
 34. Lin R, Murtazina R, Cha B, Chakraborty M, Sarker R, Chen TE, Lin Z, Hogema BM, de Jonge HR, Seidler U, Turner JR, Li X, Kovbasnjuk O, Donowitz M. D-Glucose acts via sodium/glucose cotransporter 1 to increase NHE3 in mouse jejunal brush border by a Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor 2-dependent process. *Gastroenterology* 140: 560–571, 2011. doi:10.1053/j.gastro.2010.10.042.
 35. Lütken SC, Kim SW, Jonassen T, Marples D, Knepper MA, Kwon TH, Frøkiær J, Nielsen S. Changes of renal AQP2, ENaC, and NHE3 in experimentally induced heart failure: response to angiotensin II AT1 receptor blockade. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F1678–F1688, 2009. doi:10.1152/ajprenal.00010.2009.
 36. Lytvyn Y, Perkins BA, Cherney DZ. Uric acid as a biomarker and a therapeutic target in diabetes. *Can J Diabetes* 39: 239–246, 2015. doi:10.1016/j.cjcd.2014.10.013.
 37. Maldonado-Cervantes MI, Galicia OG, Moreno-Jaime B, Zapata-Morales JR, Montoya-Contreras A, Bautista-Perez R, Martinez-Morales F. Autocrine modulation of glucose transporter SGLT2 by IL-6 and TNF- α in LLC-PK(1) cells. *J Physiol Biochem* 68: 411–420, 2012. doi:10.1007/s13105-012-0153-3.
 38. Marsenic O. Glucose control by the kidney: an emerging target in diabetes. *Am J Kidney Dis* 53: 875–883, 2009. doi:10.1053/j.ajkd.2008.12.031.
 39. Mather A, Pollock C. Glucose handling by the kidney. *Kidney Int Suppl* 79: S1–S6, 2011. doi:10.1038/ki.2010.509.
 40. Matthews VB, Elliot RH, Rudnicka C, Hricova J, Herat L, Schlaich MP. Role of the sympathetic nervous system in regulation of the sodium glucose cotransporter 2. *J Hypertens* 35: 2059–2068, 2017. doi:10.1097/HJH.0000000000001434.
 41. Moe OW, Alpern RJ, Henrich WL. The renal proximal tubule renin-angiotensin system. *Semin Nephrol* 13: 552–557, 1993.
 42. Nakamura N, Matsui T, Ishibashi Y, Yamagishi S. Insulin stimulates SGLT2-mediated tubular glucose absorption via oxidative stress generation. *Diabetol Metab Syndr* 7: 48, 2015. doi:10.1186/s13098-015-0044-1.
 43. Nascimento-Gomes G, Mello-Aires M. Effect of glucose on the kinetics of bicarbonate reabsorption in the early and middle proximal tubule. *Braz J Med Biol Res* 23: 79–85, 1990.
 44. Navar LG, Prieto MC, Satou R, Kobori H. Intrarenal angiotensin II and its contribution to the genesis of chronic hypertension. *Curr Opin Pharmacol* 11: 180–186, 2011. doi:10.1016/j.coph.2011.01.009.
 45. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, de Zeeuw D, Fulcher G, Erondou N, Shaw W, Law G, Desai M, Matthews DR, Group CPC; CANVAS Program Collaborative Group. Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 377: 644–657, 2017. doi:10.1056/NEJMoa1611925.
 46. Osorio H, Bautista R, Rios A, Franco M, Santamaria J, Escalante B. Effect of treatment with losartan on salt sensitivity and SGLT2 expression in hypertensive diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 86: e46–e49, 2009. doi:10.1016/j.diabres.2009.09.006.

47. Pacheco BPM, Crajoinas RO, Couto GK, Davel APC, Lessa LM, Rossoni LV, Girardi ACC. Dipeptidyl peptidase IV inhibition attenuates blood pressure rising in young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 29: 520–528, 2011. doi:10.1097/HJH.0b013e328341939d.
48. Packer M. Activation and inhibition of sodium-hydrogen exchanger is a mechanism that links the pathophysiology and treatment of diabetes mellitus with that of heart failure. *Circulation* 136: 1548–1559, 2017. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030418.
49. Panchapakesan U, Pegg K, Gross S, Komala MG, Mudaliar H, Forbes J, Pollock C, Mather A. Effects of SGLT2 inhibition in human kidney proximal tubular cells—renoprotection in diabetic nephropathy? *PLoS One* 8: e54442, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0054442.
50. Peruchetti DB, Silva-Aguiar RP, Siqueira GM, Dias WB, Caruso-Neves C. High glucose reduces megalin-mediated albumin endocytosis in renal proximal tubule cells through protein kinase B O-GlcNAcylation. *J Biol Chem* 293: 11388–11400, 2018. doi:10.1074/jbc.RA117.001337.
51. Pessoa TD, Campos LC, Carraro-Lacroix L, Girardi AC, Malnic G. Functional role of glucose metabolism, osmotic stress, and sodium-glucose cotransporter isoform-mediated transport on Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 activity in the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* 25: 2028–2039, 2014. doi:10.1681/ASN.2013060588.
52. Piperidou A, Sarafidis P, Boutou A, Thomopoulos C, Loutradis C, Alexandrou ME, Tsapas A, Karagiannis A. The effect of SGLT-2 inhibitors on albuminuria and proteinuria in diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hypertens* 37: 1334–1343, 2019. doi:10.1097/HJH.0000000000002050.
53. Pontes RB, Crajoinas RO, Nishi EE, Oliveira-Sales EB, Girardi AC, Campos RR, Bergamaschi CT. Renal nerve stimulation leads to the activation of the Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 via angiotensin II type I receptor. *Am J Physiol Renal Physiol* 308: F848–F856, 2015. doi:10.1152/ajprenal.00515.2014.
54. Pribanic S, Gisler SM, Bacic D, Madjdpour C, Hernando N, Sorribas V, Gantenbein A, Biber J, Murer H. Interactions of MAP17 with the NaPi-IIa/PDZK1 protein complex in renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F784–F791, 2003. doi:10.1152/ajprenal.00109.2003.
55. Rafiq K, Fujisawa Y, Sherajee SJ, Rahman A, Sufiun A, Kobori H, Koepsell H, Mogi M, Horiuchi M, Nishiyama A. Role of the renal sympathetic nerve in renal glucose metabolism during the development of type 2 diabetes in rats. *Diabetologia* 58: 2885–2898, 2015. doi:10.1007/s00125-015-3771-9.
56. Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, Smith CD, Hong G, Brown J. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 54: 3427–3434, 2005. doi:10.2337/diabetes.54.12.3427.
57. Ramkumar N, Kohan DE. Proximal tubule angiotensinogen modulation of arterial pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 22: 32–36, 2013. doi:10.1097/MNH.0b013e3283359dbed.
58. Reed JW. Impact of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors on blood pressure. *Vasc Health Risk Manag* 12: 393–405, 2016. doi:10.2147/VHRM.S111991.
59. Reyes-Pardo H, Bautista R, Vargas-Robles H, Rios A, Sánchez D, Escalante B. Role of sodium/glucose cotransporter inhibition on a rat model of angiotensin II-dependent kidney damage. *BMC Nephrol* 20: 292, 2019. doi:10.1186/s12882-019-1490-z.
60. Saad S, Stevens VA, Wassef L, Poronnik P, Kelly DJ, Gilbert RE, Pollock CA. High glucose transactivates the EGF receptor and up-regulates serum glucocorticoid kinase in the proximal tubule. *Kidney Int* 68: 985–997, 2005. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00492.x.
61. Sano M, Chen S, Imazeki H, Ochiai H, Seino Y. Changes in heart rate in patients with type 2 diabetes mellitus after treatment with luseogliflozin: subanalysis of placebo-controlled, double-blind clinical trials. *J Diabetes Investig* 9: 638–641, 2018. doi:10.1111/jdi.12726.
62. Sano M, Goto S. Possible mechanism of hematocrit elevation by sodium glucose cotransporter 2 inhibitors and associated beneficial renal and cardiovascular effects. *Circulation* 139: 1985–1987, 2019. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038881.
63. Santos-Gallego CG, Requena-Ibanez JA, San Antonio R, Ishikawa K, Watanabe S, Picatoste B, Flores E, Garcia-Ropero A, Sanz J, Hajjar RJ, Fuster V, Badimon JJ. Empagliflozin ameliorates adverse left ventricular remodeling in nondiabetic heart failure by enhancing myocardial energetics. *J Am Coll Cardiol* 73: 1931–1944, 2019. doi:10.1016/j.jacc.2019.01.056.
64. Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Miller ML, Soleimani M, Gawenis LR, Riddle TM, Duffy JJ, Doetschman T, Wang T, Giebisch G, Aronson PS, Lorenz JN, Shull GE. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet* 19: 282–285, 1998. doi:10.1038/969.
65. Schunkert H, Ingelfinger JR, Hirsch AT, Tang SS, Litwin SE, Talness CE, Dzau VJ. Evidence for tissue-specific activation of renal angiotensinogen mRNA expression in chronic stable experimental heart failure. *J Clin Invest* 90: 1523–1529, 1992. doi:10.1172/JCI116020.
66. Shin SJ, Chung S, Kim SJ, Lee EM, Yoo YH, Kim JW, Ahn YB, Kim ES, Moon SD, Kim MJ, Ko SH. Effect of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor, dapagliflozin, on renal renin-angiotensin system in an animal model of type 2 diabetes. *PLoS One* 11: e0165703, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0165703.
67. Staahltoft D, Nielsen S, Janjua NR, Christensen S, Skøtt O, Marcusen N, Jonassen TE. Losartan treatment normalizes renal sodium and water handling in rats with mild congestive heart failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F307–F315, 2002. doi:10.1152/ajprenal.00132.2001.
68. Thomson R, Thomson B, Girardi A, Kocher O, Aronson P. Interaction of NHE3 with the proximal tubule brush border scaffolding protein PDZK1 (Abstract). *FASEB J* 18: A320, 2004.
69. Thomson RB, Wang T, Thomson BR, Tarrats L, Girardi A, Mentone S, Soleimani M, Kocher O, Aronson PS. Role of PDZK1 in membrane expression of renal brush border ion exchangers. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13331–13336, 2005. doi:10.1073/pnas.0506578102.
70. Tonneijck L, Muskiet MH, Smits MM, van Bommel EJ, Heerspink HJ, van Raalte DH, Joles JA. Glomerular hyperfiltration in diabetes: mechanisms, clinical significance, and treatment. *J Am Soc Nephrol* 28: 1023–1039, 2017. doi:10.1681/ASN.2016060666.
71. Umino H, Hasegawa K, Minakuchi H, Muraoka H, Kawaguchi T, Kanda T, Tokuyama H, Wakino S, Itoh H. High basolateral glucose increases sodium-glucose cotransporter 2 and reduces sirtuin-1 in renal tubules through glucose transporter-2 detection. *Sci Rep* 8: 6791, 2018. doi:10.1038/s41598-018-25054-y.
72. Uthman L, Baartscheer A, Bleijlevens B, Schumacher CA, Fiolet JWT, Koeman A, Jancev M, Hollmann MW, Weber NC, Coronel R, Zuurbier CJ. Class effects of SGLT2 inhibitors in mouse cardiomyocytes and hearts: inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger, lowering of cytosolic Na⁺ and vasodilation. *Diabetologia* 61: 722–726, 2018. doi:10.1007/s00125-017-4509-7.
73. Vallon V. The mechanisms and therapeutic potential of SGLT2 inhibitors in diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 66: 255–270, 2015. doi:10.1146/annurev-med-051013-110046.
74. Vallon V. The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R1009–R1022, 2011. doi:10.1152/ajpregu.00809.2010.
75. Vallon V, Platt KA, Cunard R, Schroth J, Whaley J, Thomson SC, Koepsell H, Rieg T. SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* 22: 104–112, 2011. doi:10.1681/ASN.2010030246.
76. van de Borne P. The kidney and the sympathetic system: a short review. *Curr Clin Pharmacol* 8: 175–181, 2013. doi:10.2174/15748847113089990049.
77. Verma S, McMurray JJV, Cherney DZI. The metabolodiuretic promise of sodium-dependent glucose cotransporter 2 inhibition: the search for the sweet spot in heart failure. *JAMA Cardiol* 2: 939–940, 2017. doi:10.1001/jamacardio.2017.1891.
78. Wang J, Shibayama Y, Kobori H, Liu Y, Kobara H, Masaki T, Wang Z, Nishiyama A. High glucose augments angiotensinogen in human renal proximal tubular cells through hepatocyte nuclear factor-5. *PLoS One* 12: e0185600, 2017. doi:10.1371/journal.pone.0185600.
79. Wang XX, Levi J, Luo Y, Myakala K, Herman-Edelstein M, Qiu L, Wang D, Peng Y, Grenz A, Lucia S, Dobrinskikh E, D'Agati VD, Koepsell H, Kopp JB, Rosenberg AZ, Levi M. SGLT2 protein expression is increased in human diabetic nephropathy: SGLT2 protein inhibition decreases renal lipid accumulation, inflammation, and the development of nephropathy in diabetic mice. *J Biol Chem* 292: 5335–5348, 2017. doi:10.1074/jbc.M117.779520.
80. Winterberg PD, Wang Y, Lin KM, Hartono JR, Nagami GT, Zhou XJ, Shelton JM, Richardson JA, Lu CY. Reactive oxygen species and IRF1 stimulate IFN α production by proximal tubules during ischemic AKI. *Am J Physiol Renal Physiol* 305: F164–F172, 2013. doi:10.1152/ajprenal.00487.2012.

81. **Wiviott SD, Raz I, Sabatine MS.** Dapagliflozin and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 380: 1881–1882, 2019. doi:10.1056/NEJMoa1812389.
82. **Woo AL, Noonan WT, Schultheis PJ, Neumann JC, Manning PA, Lorenz JN, Shull GE.** Renal function in NHE3-deficient mice with transgenic rescue of small intestinal absorptive defect. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F1190–F1198, 2003. doi:10.1152/ajprenal.00418.2002.
83. **Woods TC, Satou R, Miyata K, Katsurada A, Dugas CM, Klingenberg NC, Fonseca VA, Navar LG.** Canagliflozin prevents intrarenal angiotensinogen augmentation and mitigates kidney injury and hypertension in mouse model of type 2 diabetes mellitus. *Am J Nephrol* 49: 331–342, 2019. doi:10.1159/000499597.
84. **Yao D, Wang S, Wang M, Lu W.** Renoprotection of dapagliflozin in human renal proximal tubular cells via the inhibition of the high mobility group box 1-receptor for advanced glycation end products-nuclear factor- κ B signaling pathway. *Mol Med Rep* 18: 3625–3630, 2018. doi:10.3892/mmr.2018.9393.
85. **Yehya A, Sadhu AR.** New therapeutic strategies for type 2 diabetes^{CME}. *Methodist Debakey Cardiovasc J* 14: 281–288, 2018. doi:10.14797/mdcj-14-4-281.
86. **Yoshikawa T, Kishi T, Shinohara K, Takesue K, Shibata R, Sonoda N, Inoguchi T, Sunagawa K, Tsutsui H, Hirooka Y.** Arterial pressure lability is improved by sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor in streptozotocin-induced diabetic rats. *Hypertens Res* 40: 646–651, 2017. doi:10.1038/hr.2017.14.
87. **Yoshimoto T, Furuki T, Kobori H, Miyakawa M, Imachi H, Muraio K, Nishiyama A.** Effects of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors on urinary excretion of intact and total angiotensinogen in patients with type 2 diabetes. *J Investig Med* 65: 1057–1061, 2017. doi:10.1136/jim-2017-000445.
88. **Zhang SL, Filep JG, Hohman TC, Tang SS, Ingelfinger JR, Chan JS.** Molecular mechanisms of glucose action on angiotensinogen gene expression in rat proximal tubular cells. *Kidney Int* 55: 454–464, 1999. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00271.x.
89. **Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, Mattheus M, Devins T, Johansen OE, Woerle HJ, Broedl UC, Inzucchi SE; EMPA-REG OUTCOME Investigators.** Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 373: 2117–2128, 2015. doi:10.1056/NEJMoa1504720.

