

Lidiane Paula Ardisson

Influência da Dieta AIN-93 na Mortalidade e no Processo de Remodelação Cardíaca Após o Infarto do Miocárdio

Dissertação Apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica, área de concentração: Nutrição.

Orientador: Prof. Adj. *Leonardo A. M. Zornoff*

Co-orientador: Prof. Adj. *Sérgio A. R. Paiva*

**Botucatu
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Ardisson, Lidiane Paula.

Influência da dieta AIN-93 na mortalidade e no processo de remodelação cardíaca após o infarto do miocárdio / Lidiane Paula Ardisson. – Botucatu : [s.n.], 2009

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2009.

Orientador: Leonardo A. M. Zornoff

Co-orientador: Sérgio A. R. Paiva

Assunto CAPES: 40101002

1. Infarto do miocárdio - Aspectos nutricionais 2. Infarto do miocárdio – Fisiopatologia - Estudos experimentais

CDD 616.124

Palavras-chave: Arritmia; AIN-93; Remodelação cardíaca

Se podes olhar, vê. Se podes ver, repara.

(Ensaio Sobre A Cegueira, JOSÉ SARAMAGO)

Dedicatória

Aos meus pais VIRGÍNIA, MARCOS, PAULO e CLARICE, por serem meus exemplos de vida, caráter, dedicação, humildade e de amor.

Aos meus irmãos FLAVIANE, JUNIOR e DAIANE, pelo incentivo e carinho de sempre. À JULIANA que apesar da ausência continua sempre presente e que lá do céu continua a me incentivar.

A toda minha FAMÍLIA pelo apoio.

Agradecimentos

À DEUS por me iluminar, guiar e abençoar em todas as horas da minha vida e pelas oportunidades proporcionadas.

À FABIANA DENIPOTE minha grande amiga e irmã de todas as horas.

Aos meus amigos MARIELE, OZIAS, FRANCIELE, RODRIGO, FABIANA, MARITA e RENATA minha família aqui em Botucatu.

À Profa. Adj. BEATRIZ BOJIKIAN MATSUBARA pela realização do estudo ecocardiográfico e por ter auxiliado na prova de qualificação.

Ao Prof. Dr. KATASHI OKOSHI por ter contribuído na prova de qualificação.

À Profa. LÉA SILVA SANT'ANA pelo auxílio na análise bromatológica.

Aos colegas do Laboratório pelo carinho e auxílio ANA PAULA, André Soares, ANDRÉ LEOPOLDO, MARIA TERESA, PAULA, SÍLVIO, DIJON, CRISTIANA, MARCELO e RICARDO. Adoro vocês!

Aos funcionários do Departamento e do Laboratório Experimental de Clínica Médica, MÁRIO BRUNO, JOSÉ CARLOS GEORGETE, SANDRA FÁBIO, SUELI CLARA, ELENIZE JAMAS, CORINA CORRÊA, CAMILA CAMACHO, VITOR SOUZA, ROGÉRIO MONTEIRO, JOSÉ APARECIDO DE SOUZA, ELIZANGELA SILVA, BRUNO FAJIOLLI, BRUNO SILVA, ALEXANDRE LOUREIRO, RENATO PEREIRA, LAURA ANDRADE CÂMARA, MARIO AUGUSTO DALLAQUA e ANA MENGUE. Obrigada pelo auxílio e simpatia.

Ao pessoal da seção de Pós-Graduação, REGINA SPADIN, LÍLIAN NUNES, ANDRÉA DEVIDÉ, JANETE NUNES SILVA e NATHANAEL SALLES pela disposição em sempre ajudar.

À bibliotecária ROSEMARY CRISTINA DA SILVA e SELMA MARIA DE JESUS, pelo auxílio na revisão bibliográfica e confecção da ficha catalográfica deste trabalho.

À COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Agradecimentos Especiais

Ao professor LEONARDO ANTONIO MAMEDE ZORNOFF pelos ensinamentos, paciência e dedicação. Meu exemplo de bom orientador que vou levar por toda minha vida.

Ao professor SÉRGIO ALBERTO RUPP DE PAIVA pela dedicação e ensinamentos e por participar da co-autoria desse projeto.

À Dr^a. PAULA SCHMIDT AZEVEDO GAIOLLA e ao Dr. MARCOS FERRERIA MINICUCCI obrigada pelos ensinamentos e auxílio no desenvolvimento desse projeto.

Muito Obrigada!

Sumário

1. Introdução	1
2. Hipótese	6
3. Objetivo	8
4. Matérias e Métodos	10
5. Resultados	19
6. Discussão	37
7. Resumo	46
8. Abstract	49
9. Referências Bibliográficas	51

Lista de Abreviações

AD – área diastólica
AS – área sistólica
ASM – área seccional do miócito
AE – átrio esquerdo
Ao – aorta
C – grupo controle
Ca – cálcio
CHO – carboidrato
DC – débito cardíaco
DDVE – diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DSVE – diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
EE – extrato etéreo
EPP – espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo
FC – frequência cardíaca
FAV – fração de variação de área do ventrículo esquerdo
HE – hematoxilina-eosina
IAM – infarto agudo do miocárdio
K – potássio
Mg – magnésio
P – fósforo
PB – proteína bruta
PC – peso do rato
VD – ventrículo direito
VE – ventrículo esquerdo
VS – volume sistólico
VTI – integral de velocidade tempo
VSVE – volume de saída do ventrículo esquerdo
TRIV – tempo de relaxamento isovolumétrico
TRIV/RR^{0,5} – tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado FC

1. Introdução

O processo de remodelação cardíaca é definido como variações celulares, moleculares e intersticiais, que se manifestam clinicamente por meio de alterações no tamanho, massa, geometria e na função do coração, em resposta a determinada agressão⁽¹⁻³⁾.

A princípio, a remodelação ventricular tem como objetivo manter a função cardíaca estável em situações de agressão. Cronicamente, entretanto, com a continuidade do processo, ocorre disfunção ventricular progressiva e morte⁽⁴⁾. Por esse motivo, inúmeras estratégias vêm sendo utilizadas para prevenir ou atenuar o processo de remodelação ventricular secundário a diversos estímulos. Por outro lado, estratégias que intensificam a remodelação devem ser evitadas.

Os mecanismos moduladores da remodelação ainda não estão totalmente esclarecidos. Aceita-se, entretanto, que esse processo é influenciado por diversos estímulos, como: fatores mecânicos (sobrecarga hemodinâmica, pressórica ou volumétrica), bioquímicos (angiotensina II, endotelina 1, catecolaminas, fator de necrose tumoral, interleucinas 1 e 6, fator de crescimento transformador β 1, fator de crescimento semelhante à insulina 1, óxido nítrico, cálcio, estresse oxidativo) e genéticos (cardiomiopatia hipertrófica e dilatada) que podem desencadear ou regular a remodelação cardíaca^(3,5,6).

Independente do estímulo, uma das características mais marcantes do processo de remodelação é a modificação do padrão de expressão de genes que codificam diversas proteínas. Por exemplo, ocorre aumento ou a re-expressão de genes do período fetal, tais como peptídeo natriurético atrial, a enzima conversora de angiotensina e as isoformas fetais de proteínas contráteis. As causas e as possíveis vantagens ou desvantagens desse comportamento ainda não estão suficientemente esclarecidas. Aceita-se, entretanto, que a expressão genética fetal seja tanto um marcador como um dos mecanismos propriamente envolvidos na progressão do processo de remodelação cardíaca, até o aparecimento da disfunção ventricular⁽⁴⁾.

A associação entre mudança de expressão e disfunção ventricular é complexa e envolve a síntese alterada de proteínas, as quais participam dos aspectos: estrutura e função cardíaca.

Entre os diversos fatores que, potencialmente, podem ter papel fisiopatológico na progressão da disfunção ventricular no coração remodelado destacam-se:

- ✓ Morte Celular - é classificada como perda progressiva de miócitos e pode participar da deterioração da função ventricular. Podemos identificar três mecanismos de morte de miócitos: a autofagia, a necrose e a apoptose ou morte celular programada⁽⁷⁾.
- ✓ Alterações das Proteínas Contráteis - o processo de remodelação ventricular caracteriza-se por alterações da miosina, a principal proteína contrátil composta de um par de cadeias pesadas (α e β) e dois pares de cadeias leves. A capacidade ATPásica da miosina depende de sítios ativados localizados nas cadeias pesadas, possuindo a fração α a maior capacidade ATPásica, a qual determina a capacidade contrátil dos miócitos. Durante a remodelação, há predomínio da forma fetal das cadeias leves de miosina. Além disso, ocorre aumento da forma β e diminuição da fração α , o que poderia justificar a depressão funcional que acompanha a remodelação⁽⁸⁾.
- ✓ Fibrose - o colágeno é uma das formas celulares presentes no miocárdio e possui várias funções como: regular a apoptose, resistir às deformações patológicas, manter o alinhamento das estruturas, regular a distensibilidade cardíaca e a transmissão de força durante o encurtamento das fibras cardíacas. Portanto, o tecido colágeno é importante modulador da função cardíaca sistólica e diastólica. Já está bem documentado que há acúmulo de colágeno (fibrose) em diversas situações patológicas, como por exemplo, no infarto agudo do miocárdio. Nessas condições, a fibrose está associada à deterioração da função ventricular^(9,10, 11).
- ✓ Alterações das Metaloproteases - as fibras colágenas são resistentes à degradação causada pela maioria das proteases, entretanto, algumas enzimas possuem atividade colagenolítica, entre as quais se destacam as metaloproteases. Essas enzimas encontram-se na forma inativada, podendo ser ativada por uma série de estímulos, como mecânicos, isquêmico, entre outros. Sendo assim, quando ativada, ocorre quebra da rede de colágeno

interfibrilar podendo haver inúmeras conseqüências, tanto na arquitetura como na função ventricular⁽¹²⁾.

- ✓ Alterações da via Beta-adrenérgica e Transporte de cálcio - estas duas vias são responsáveis pelo trânsito de cálcio nos miócitos, o qual possui papel importante na contração e relaxamento do miocárdio. Portanto, alterações nessas duas vias desempenham papel crítico na deterioração na função cardíaca no coração remodelado⁽⁸⁾.
- ✓ Citoesqueleto - formado por diversas proteínas (tubulina, desmina e titina), que contribuem para a manutenção da geometria, da integridade estrutural, da resistência mecânica dos miócitos cardíacos e na transmissão de sinais de membrana celular ao núcleo. Especula-se que anormalidades do citoesqueleto desempenham papel de destaque da deterioração da função cardíaca no coração remodelado⁽¹³⁾.
- ✓ Déficit Energético - é responsável pela alteração na função cardíaca que resulta no desequilíbrio entre oferta e consumo de oxigênio. Em conseqüência, todas as proteínas miocárdicas com capacidade ATPásica, como as de cadeia da miosina e as responsáveis pela captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, podem apresentar déficits em suas funções, com deterioração da função cardíaca sistólica e diastólica⁽⁶⁾.
- ✓ Hipertrofia e Alterações Geométricas - um dos principais mecanismos pelos quais o miócito se adapta a um determinado estímulo é o processo de hipertrofia. Usualmente, o padrão existente nas fases avançadas de disfunção ventricular é do tipo excêntrica. Atualmente, aceita-se que mudanças geométricas poderiam mudar as condições de carga a que o coração é submetido e comprometer a função global do coração⁽¹⁴⁾.

Nos últimos anos, diversos pesquisadores têm se preocupado com o papel da alimentação no processo de remodelação cardíaca. Em diferentes modelos experimentais, em situações fisiológicas ou patológicas, vários estudos mostraram que alterações de diferentes componentes da dieta podem resultar em modificações bioquímicas, no ritmo, na função e na morfologia do coração. Portanto, especula-se que componentes da dieta possam atuar como agressor ou modulador da remodelação cardíaca⁽¹⁵⁾.

Recentemente, nosso laboratório passou a utilizar a dieta AIN-93. Essa dieta é amplamente utilizada em modelos experimentais por possuir composição química definida, os vários componentes dietéticos são identificados e quantificados ⁽¹⁶⁾. Adicionalmente, dietas com composição definida permitem modificações específicas em alguns componentes como, por exemplo, diminuição na quantidade de determinada vitamina. Em estudo piloto de nosso laboratório, ratos Wistar alimentados com a dieta AIN-93 foram submetidos ao infarto do miocárdio experimental, por oclusão da artéria coronária esquerda. De forma surpreendente, observamos elevada taxa de mortalidade com a dieta AIN-93. Nesses animais, a mortalidade na fase aguda (<48 horas) foi ao redor de 80%. Esses números são diferentes do padrão observado em estudos prévios, que observaram mortalidade de 40-60% nas primeiras 48 horas⁽¹⁷⁾. Nesse período, a principal causa de morte são as arritmias, principalmente taquicardia ventricular sustentada e fibrilação ventricular. Outras potenciais causas de óbito são a remodelação e a disfunção ventricular grave. Na fase crônica do infarto, entre o período de 48 horas e 3 meses, a mortalidade dos animais alimentados previamente com a AIN-93 situou-se ao redor de 50%. Usualmente, a mortalidade após 3 meses é de 30%, em consequência da remodelação ventricular⁽¹⁷⁾.

Cabe ressaltar, que quando o estudo piloto foi desenvolvido não havia um grupo de animais alimentados com outra dieta que pudesse servir de controle e assim, a alta mortalidade ser confirmada.

Pelo exposto, consideramos a possibilidade de que algum componente da dieta AIN-93, em excesso ou deficiência, poderia ser responsável pelo aumento de mortalidade após o infarto observado em nosso estudo piloto. Adicionalmente, o aumento da mortalidade poderia estar relacionado à presença de arritmias ou estar associado ao processo de remodelação ventricular.

2. Hipótese

A dieta AIN-93 aumenta a mortalidade após o infarto agudo do miocárdio em ratos.

3. Objetivo

Avaliar a influência da dieta AIN-93 na mortalidade e no processo de remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio em ratos.

4. Material e Métodos

4.1 Protocolo Experimental

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp (protocolo número 562/2006), estando em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Para este estudo foram utilizados ratos da raça Wistar, machos, provenientes do Biotério do Laboratório Experimental da Clínica Médica da UNESP de Botucatu. Após o desmame (aproximadamente 21 dias), os animais foram divididos em dois grupos: Grupo controle (n=62), formado pelos animais que receberam a dieta padrão de nosso laboratório (Labina); Grupo AIN93 (N=70), formado pelos animais que receberam a dieta AIN-93.

Com 150g de peso corporal, foi aferida a pressão arterial e a frequência cardíaca dos animais de ambos os grupos. Posteriormente, entre 200 - 250g, os animais foram submetidos ao infarto experimental. Após 3 meses do infarto foi realizado o ecocardiograma para avaliação morfológica e funcional cardíaca. Em seguida os animais foram anestesiados e sacrificados para coleta do material para o estudo morfométrico. A mortalidade dos animais foi observada diariamente desde o infarto até o momento do sacrifício.

Paralelamente, em 5 animais de cada grupo, sem infarto, com peso entre 200-250g, foi realizada coleta de sangue para análise dos eletrólitos séricos (cálcio, sódio, magnésio, fósforo e potássio). Posteriormente, esses animais foram sacrificados.

O consumo de ração e o peso corporal dos ratos foram aferidos semanalmente, utilizando-se uma balança digital Mettler® modelo Spider 2. Até o infarto, os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno individuais forradas com maravalha de *Pinus* esterilizada, com tampa de arame cromado, ambiente com temperatura (22 - 26°C) e luminosidade (ciclo claro e escuro - 12h) controlados. Após o infarto, foram acondicionados grupos de 5 animais por gaiola e mantidas as mesmas condições citadas anteriormente.

4.2 Dosagem de Eletrólitos

Amostras de sangue foram coletadas quando os animais alcançaram peso entre 200-250g. Ao invés de irem para o infarto experimental, esses animais foram sacrificados por alta dose de anestésico pentobarbital sódico e, posteriormente, o sangue armazenado nos ventrículos foi coletado por punção. Em seguida, o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm para a obtenção do soro. A partir dessas amostras foram determinados os seguintes eletrólitos: fósforo, cálcio, sódio, magnésio e potássio. Os métodos e os valores de normalidade dos parâmetros laboratoriais que foram utilizados estão detalhados na tabela 1.

Tabela 1 - Métodos de análise e valores de normalidade dos eletrólitos séricos.

Eletrólito	Método	Valor de Normalidade
Fósforo	Colorimétrico, química seca com Molibdato. Vitrus 950	5,8 – 11,2 mg/dl
Cálcio	Colorimétrico, química seca com Arsenazo III. Vitrus 950	5,3 – 11,6 mg/dl
Sódio	Potenciometria, química seca. Vitrus 950	135 – 146 mmol/L
Potássio	Potenciometria, química seca. Vitrus 950	4,0 – 5,9 mmol/L
Magnésio	Colorimétrico, química seca. Vitrus 950	—

4.3 Pressão Arterial Sistólica e Frequência Cardíaca

Para aferição da pressão arterial sistólica, os ratos foram previamente aquecidos à temperatura de 40°C por 5 minutos, em caixa de madeira (50X40cm) forrada com maravalha de *Pinus* autoclavada, com a finalidade de produzir vasodilatação da artéria caudal. A pressão arterial da cauda foi medida por plestimografia, utilizando-se electro-sphygmomanometer, Narco Bio-System®, modelo 709-0610 (International Biomedical, Inc, USA). O manguito foi colocado em torno da cauda do animal e conectado a transdutor de pulso (Gould). O manguito foi insuflado a valor superior à pressão arterial sistólica, e, em seguida, desinsuflado, para registro das pulsações arteriais em polígrafo Gould, modelo RS 3200 ⁽¹⁸⁾.

4.4 Infarto do Miocárdio Experimental

O infarto do miocárdio foi produzido de acordo com método descrito previamente ^(17,19-21). O procedimento foi feito pelo mesmo pesquisador durante todo período do estudo e o mesmo não tinha conhecimento de que grupo pertencia cada animal. Os ratos, pesando entre 200-250g, foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e submetidos à toracotomia lateral esquerda. Após exteriorização do coração, o átrio esquerdo foi afastado e a artéria coronária esquerda ligada com fio mono-nailon 5.00 entre a saída da

artéria pulmonar e o átrio esquerdo. A seguir, o coração retornou ao tórax, os pulmões inflados com pressão positiva e o tórax fechado por suturas com linha de algodão 10.

4.5 Avaliação Morfológica e Funcional pelo Ecocardiograma

Após três meses do infarto, os animais sobreviventes foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e cloridrato de xilidino (1mg/kg), por via intramuscular, para o estudo ecocardiográfico. Após a tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em aparato de madeira próprio e colocados em decúbito lateral esquerdo, para realização do ecocardiograma, utilizando-se equipamento da Philips (HDI 5000) dotado de transdutor eletrônico de 12 MHz. A avaliação dos fluxos transvalvar mitral e aórtico foi realizada com o mesmo transdutor, operando em 5,0 MHz.

As medidas das estruturas cardíacas foram efetuadas no modo-M, obtidas com o feixe de ultra-som orientado pela imagem bidimensional, na posição para-esternal no eixo menor. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o cursor do modo-M entre os músculos papilares, logo abaixo do plano da valva mitral. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição para-esternal eixo menor, com o cursor do modo-M posicionado ao nível da valva aórtica. O registro da imagem monodimensional (velocidade: 100 mm/s) foi realizado por meio da impressora modelo UP-890MD da Sony Co. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography⁽²²⁾ e já validadas no modelo de ratos infartados⁽²³⁾. As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e a espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo (EPP) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE) foi medido no momento da excursão sistólica máxima da parede da cavidade. As áreas diastólicas (AD) e sistólicas (AS) foram

medidas no modo bidimensional, por meio de planimetria, em dois planos paraexternais: eixo longo e eixo menor. A função sistólica do ventrículo esquerdo foi avaliada calculando-se a fração de variação de área ($FVA = \frac{AD-AS}{AD} \times 100$)⁽²³⁾, obtida pela média dos valores dos dois eixos⁽²²⁾. O volume sistólico (VS) e o débito cardíaco (DC) foram calculados, segundo a fórmula: $VS = VTI \times \pi \left(\frac{VSVE}{2}\right)^2$ e $DC = VS \times FC$, onde VTI = integral da velocidade tempo, VSVE diâmetro da via de saída do ventrículo esquerdo e FC = frequência cardíaca⁽²⁴⁾. A VSVE foi medida imediatamente abaixo das cúspides da veia aórtica na posição paraesternal, eixo maior. O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) medido corresponde ao tempo entre o fechamento da válvula aórtica e a abertura da mitral. O fluxo diastólico transmitral (ondas E e A) foi obtido com o transdutor na posição apical quatro câmaras. As medidas referentes aos fluxos foram realizadas diretamente no monitor do ecocardiógrafo.

4.6 Coleta de Material Biológico

Após a realização do ecocardiograma, os animais foram submetidos a eutanásia com dose excessiva de pentobarbital sódico e, posteriormente, foram retirados sangue, coração, pulmão e fígado. O sangue contido no ventrículo foi removido por punção e centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm, e a 4°C para extração do soro e, em seguida, congelado a -80°C. O fígado, pulmão e coração foram imersos em soro fisiológico para retirada do sangue. Os ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) e o átrio esquerdo (AE) foram dissecados e pesados.

Em seguida, foi realizado corte transversal entre 4 a 6 mm do ápice para a base do VE, pelo fato desta região refletir a média da área dos resultados de cortes de todo ventrículo⁽²⁵⁾. Um fragmento de 3 mm foi colocado em formol tamponado a 10%, juntamente com fragmentos do pulmão, fígado e VD por 24 horas, posteriormente foram lavados em água corrente por mais 24hs e em seguida, colocados em álcool 70% antes de serem colocados no bloco de parafina.

Os pesos úmidos do VE, pulmão, fígado e AE foram aferidos e posteriormente colocados em estufa a 65°C por 48hs. Em seguida, os pesos

secos foram aferidos. A relação entre peso seco e úmido foi utilizada para caracterizar a porcentagem de líquidos nesses tecidos.

A base do VE foi dividida em 2 segmentos longitudinais e o ápice em corte transversal. Esses fragmentos e amostras de VD, fígado e pulmão foram congelados a -80°C.

4.7 Estudo Morfométrico

Após ser inserido no bloco de parafina, o corte histológico do VE foi seccionado em cortes de 5 micrômetros de espessura. Em seguida, foram corados em lâmina com solução Hematoxilina - Eosina (HE) para aferição da área seccional transversa dos miócitos (ASM), empregando-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus 3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram mensuradas 50 a 70 células por ventrículo analisado pela objetiva 40X. Os miócitos selecionados estavam seccionados transversalmente, apresentavam forma redonda, núcleo visível no centro da célula e localizados na camada sub-endocárdica da parede muscular do ventrículo esquerdo. As áreas seccionais médias obtidas para cada grupo foram utilizadas como indicador do tamanho celular.

Lâminas coradas pela técnica picrosirius red (sirius red F3BA em solução aquosa ácido pícrico) específico para visualização de colágeno foram analisadas. Foram visualizados aproximadamente 20 campos por ventrículo utilizando objetiva de 40X. Os campos escolhidos estavam localizados longe da área infartada e afastados da região perivascular^(26,27).

A extensão do músculo infartado e viável nas circunferências endocárdica e epicárdica foi determinada por planimetria. O tamanho do infarto foi calculado pela divisão das circunferências ventriculares endocárdicas e epicárdica da região infartada pelas circunferências endocárdica e epicárdica totais.

4.8 Composição química da ração

As rações utilizadas neste estudo passaram por análises bromatológicas para análise: calorias, macronutrientes e minerais.

4.8.1 Método de Determinação de Calorias

Para obter a composição calórica, foi adicionado óleo mineral à ração e feita a leitura no calorímetro PARR.

4.8.2 Método de Determinação de Proteína

A composição protéica foi determinada pelo Método de Kjeldahl⁽²⁸⁾. O valor de proteína foi obtido pela multiplicação do fator 6,25.

4.8.3 Método de Determinação do Lipídio

A composição lipídica das rações foi determinada pelo método gravimétrico proposto pelo Instituto Adolfo Lutz⁽³⁹⁾.

4.8.4 Método de Determinação do Carbohidrato

O carboidrato (CHO) foi quantificado pela seguinte equação:

$$\text{CHO} = 100 - (\text{EE} + \text{PB} + \text{cinzas} + \text{umidade}),$$
 onde EE = extrato etéreo ou lipídeo e PB = proteína bruta⁽³⁰⁾.

As cinzas e o teor de umidade das rações também foram avaliados pelo método gravimétrico⁽²⁸⁾.

4.8.5 Método de Determinação dos Minerais e Metais Presentes nas Rações

Os minerais e metais avaliados neste estudo foram: fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), boro (Bo), cobre (Cu), ferro (Fe), Manganês (Mn), zinco (Zn), arsênio (As), cádmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), Mercúrio (Hg), molibdênio (Mo), níquel (Ni), chumbo (Pb), selênio (Se) e silício (Si).

Para a extração dos elementos, as rações passaram pelo processo de digestão ácida nítrico-perclórica⁽³¹⁾. Os eletrólitos foram quantificados por:

- Espectrofotometria de Absorção atômica - K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn e Zn (Espectrofotômetro Interlocked Gas Control System);
- Forno de Grafite - Mo, Co, Cd, Pb, Hg, As, Se, Cr e Ni (Equipamento Marca PerkinElmer modelo Analyst 700);
- Espectrofotômetro Lambda 10 AS91 - P, S e Bo.

4.9 Análise Estatística

Para as variáveis categóricas, o teste utilizado foi o χ^2 . Para as variáveis contínuas paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em média \pm desvio padrão e as comparações entre os grupos foram feitas pelo teste *t de Student*. Para variáveis não paramétricas, os resultados obtidos foram apresentados em mediana e intervalo interquartil e as comparações entre os grupos foram feitas pelo teste de Mann-Whitney. A mortalidade foi avaliada pela curva de Kaplan Meier e as diferenças entre as curvas pelo teste de log-rank. O nível de significância adotado foi de 5%.

Os resultados foram analisados pelo pacote estatístico Sigma Stat for Windows v 2.03 da SPSS.

5. Resultados

5.1 Eletrólitos

Em relação aos eletrólitos séricos, os valores de Ca, K, Mg, Na e P foram menores no grupo AIN-93, quando comparados com o controle (Tabela 2 e Figuras 1, 2, 3, 4 e 5).

5.2 Variáveis Cardíacas

Não houve diferença na pressão arterial sistólica aferida antes do infarto (C = 130 (120-130) mmHg; AIN-93 = 130 (120-130) mmHg; $p = 0,964$). A frequência cardíaca, entretanto, mostrou-se significativamente maior no grupo AIN-93 do que no grupo controle (Figura 6).

Em relação ao tamanho do infarto, não foi observada diferença estatística entre os dois grupos avaliados (C = $29,7 \pm 17,2\%$; AIN-93 = $32,6 \pm 18,4\%$; $p = 0,677$).

Considerando a mortalidade observada após o infarto durante todo o período de observação, o grupo AIN-93 apresentou maior mortalidade em relação ao controle (C = 66%; AIN-93 = 85,7%; $p = 0,017$) (Figura 7). A maior taxa de mortalidade ocorreu nas primeiras 24 horas após IAM (93% dos óbitos); nesse período, a mortalidade também foi maior no grupo AIN93 em comparação ao grupo C (C = 61%; AIN-93 = 80%; $p < 0,001$) (Figura 8). Na fase crônica do infarto, entretanto, compreendendo o período de 24 horas até três meses, a mortalidade do grupo AIN-93 foi semelhante ao do grupo controle (C = 4,8%; AIN-93 = 5,7%; $p = 0,138$).

Os resultados obtidos na avaliação feita pelo ecocardiograma estão apresentados nas tabelas 3 e 4.

Em relação às variáveis morfológicas, o diâmetro da aorta foi maior no grupo AIN-93 quando comparado com o C (C = $3,3 \pm 0,3$ mm; AIN-93 = $3,6 \pm 0,3$ mm; $p=0,03$) (Figura 9). Por outro lado, o DDVE/PC (C = $23,9 \pm 3,6$ mm/kg; AIN-93 = $20,2 \pm 2,6$ mm/kg; $p=0,008$) (Figura 10), as AD/PC (C = $2,7 \pm 0,5$ cm²/kg; AIN-93 = $2,2 \pm 0,4$ cm²/kg; $p=0,02$) e AS/PC (C = $2,2 \pm 0,5$ cm²/kg; AIN-

93 = $1,7 \pm 0,4$ cm²/kg; p=0,02), no eixo maior, foram menores no grupo AIN-93 em comparação com C (Figuras 11 e 12).

Considerando os dados funcionais, não foram encontradas diferenças entre os dois grupos em relação à função sistólica. Em relação às variáveis de função diastólica, a onda E foi menor (C = $100,9 \pm 17,2$ cm/s; AIN-93 = $81,7 \pm 19,2$ cm/s; p=0,009) e o TRIV/RR foi maior (C = 58 (55-70); AIN-93 = 66 (64-80); p=0,05) no grupo AIN-93, quando comparados com o grupo controle (Figura 13 e 14).

O teor de água do coração foi menor no grupo AIN-93 do que no C (C = 75% (74-76); AIN93 = 73,7% (67-74); p=0,006), após 3 meses do infarto (Figura 15). Em relação ao conteúdo de colágeno, houve forte tendência do grupo AIN-93 apresentar menores valores que C (C = 4,4 (2,9 - 7,5) %; AIN93 = 2,9 (2,0 - 5,0) %; p=0,07).

5.3 Variáveis Dietéticas

Em relação aos componentes da dieta, estes estão listados na tabela 6. Observa-se diferença quanto aos ingredientes que são utilizados para a produção das rações AIN-93 e Labina.

Considerando os macronutrientes, a dieta AIN-93 apresentou maior quantidade calórica (Figura 16), de carboidratos (Figura 17) e de lipídio (Figura 18) e menor quantidade de proteína (Figura 19), quando comparada com a ração Labina. As quantidades de micronutrientes e metais das duas rações estão ilustradas na tabela 7. Observa-se que os valores de Ca, K, e P foram menores na dieta AIN-93, quando comparada com a dieta Labina. Entretanto, a quantidade de Mg foi maior na dieta AIN-93.

Em relação à ingestão diária de ração, não houve diferença estatística no período que precedeu o IAM. (C = 19,4g; AIN-93 = 18,45g; p = 0,083). No período pós-IAM, entretanto, a ingestão de ração foi menor no grupo AIN-93 do que C (Figura 20) (C = 22,8g (15,9-17,3); AIN-93 = 16,6g (22,3-23,4); p = 0,001).

Tabela 2 - Valor dos eletrólitos séricos pré -IAM

	Grupo C (n=21)	Grupo AIN-93 (n=10)	p
Cálcio (mg/dl)	10,6 ± 0,3	9,96 ± 0,37	0,019
Potássio (mmol/l)	4,44 ± 0,3	3,04 ± 0,29	0,001
Magnésio (mg/dl)	2,7 ± 0,15	1,9 ± 0,12	0,001
Sódio (mmol/l)	138 ± 2,2	128 ± 2,2	0,001
Fósforo (mg/dl)	7,4 ± 0,8	5,6 ± 0,4	0,002

Tabela 3 - Dados morfológicos do ecocardiograma 3 meses após o IAM

	Grupo C (n=21)	Grupo AIN-93 (n=10)	P
PC (g)	453 ± 54	486 ± 60	0,14
AE (mm)	7,1 (6,2–7,6)	6,4 (5,0-8,0)	0,56
Ao (mm)	3,3 ± 0,3	3,6 ± 0,3	0,03
AE/Ao	2,1 ± 0,4	1,8 ± 0,6	0,24
AE/PC (mm/kg)	15,5 ± 3,2	13,6 ± 3,6	0,15
DDVE (mm)	10,6(10,2 – 10,9)	10,4 (8,4 – 11,5)	0,43
DDVE/PC (mm/kg)	23,9 ± 3,6	20,2 ± 2,6	0,008
EPP (mm)	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,1	0,73
EPP/DDVE	0,12 ± 0,03	0,14 ± 0,03	0,16
AS menor/PC (cm ² /kg)	1,38 (1,3-1,4)	1,29 (0,93-1,5)	0,52
AD menor/PC (cm ² /kg)	2,0 (1,8-2,2)	1,8 (1,4-2,0)	0,18
AS maior /PC (cm ² /kg)	2,2 ± 0,5	1,7 ± 0,4	0,02
AD maior/PC (cm ² /kg)	2,7 ± 0,5	2,2 ± 0,4	0,02

IAM: infarto agudo do miocárdio; Grupo C: animais infartados alimentados com dieta padrão; Grupo AIN-93: animais infartos alimentados com dieta AIN-93; PC: peso corpóreo; AE: diâmetro átrio esquerdo; Ao: diâmetro da aorta; AE/Ao: relação entre diâmetro do átrio esquerdo e aorta; PC: peso do rato; DDVE/PC: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo corrigida pelo peso; EPP: espessura diastólica da parede posterior; EPP/DDVE: relação entre espessura diastólica da parede posterior e diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; AS menor/PC: área sistólica da cavidade do ventrículo esquerdo no eixo menor corrigida pelo peso; AD menor/PC: área diastólica da cavidade do ventrículo esquerdo no eixo menor corrigido pelo peso; AS maior/PC área sistólica da cavidade do ventrículo esquerdo no eixo maior corrigida pelo peso corpóreo; AD maior/PC: área diastólica da cavidade do ventrículo esquerdo no eixo maior corrigida pelo peso corpóreo. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica).

Tabela 4 - Dados funcionais do ecocardiograma 3 meses após o IAM

	Grupo C (n=21)	Grupo AIN-93 (n=10)	P
Onda E (cm/s)	100,9 ± 17,2	81,7 ± 19,2	0,009
Onda A (cm/s)	37 (16 -78)	49 (20-62)	0,73
E/A	2,0 (1,2 – 6,1)	1,3 (1,1-5,0)	0,78
TRIV (ms)	27,9 ± 6,7	32,3 ± 3,2	0,07
TRIV/RR ^{0,5}	58 (55-70)	66 (64-80)	0,05
FC (bpm)	287 ± 39	306 ± 60	0,32
VAo (cm/s)	90 (74-96)	79,5 (76-84)	0,26
DC (ml/min)	47 (45-75)	57 (50-60)	0,41
VS (ml/min)	0,18 (0,1-0,2)	0,19 (0,1-0,2)	0,91
FAV menor (%)	31,2 ± 8,2	31,3 ± 8,7	0,97
FAV maior (%)	20,6 ± 6,3	25,5 ± 9,3	0,09
FAV média (%)	25,9 ± 5,4	28,4 ± 8,1	0,32

IAM: infarto agudo do miocárdio; Grupo C: animais infartados alimentados com dieta padrão; Grupo AIN-93: animais infartados alimentados com dieta AIN-93; E/A: relação entre as ondas E e A avaliadas pelo fluxo transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TRIV/RR^{0,5}: tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela frequência cardíaca; FC: frequência cardíaca; VAo: velocidade do sangue na aorta; DC: débito cardíaca; VS: volume sistólico; FAV menor: fração de variação de área no diâmetro menor; FAV maior: fração de variação da área no eixo maior. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica).

Tabela 5 - Dados morfométricos dos ratos 3 meses após o IAM

	Grupo C (n=21)	Grupo AIN-93 (n= 10)	p
VD (g)	0,46 ± 0,16	0,45 ± 0,2	0,83
VE (g)	0,97 ± 0,18	1,1 ± 0,2	0,07
VE/PC (g/kg)	1,9 (1,8-2,3)	2,3 (1,9-2,6)	0,19
VD/PC (g/kg)	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,32
AE/PC (g/kg)	0,21 ± 0,025	0,22 ± 0,024	0,69
Teor de água pulmão (%)	72 (65-76)	70 (52-76)	0,38
Teor de água fígado (%)	69,1 (68,6-70,4)	69,2 (68,6-69,8)	0,84
Teor de água coração (%)	75 (74-76)	73,7 (67-74)	0,006
ASM (µm)	344 ± 69,5	393 ± 111	0,15
IC (%)	4,4 (2,9 – 7,5)	2,9 (2,0 – 5,0)	0,07

IAM: infarto agudo do miocárdio; Grupo C: animais infartados alimentados com dieta padrão; Grupo AIN-93: animais infartados alimentados com dieta AIN-93; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo; PC: peso corpóreo; AE: átrio esquerdo; ASM: área seccional do miócito; IC: índice de colágeno. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica).

Tabela 6 - Ingredientes utilizados para a produção das rações

Labina: milho integral, casca de arroz, remoído de trigo, farinha de trigo, soja integral, óleo de soja, sal comum, pré-mix vitamínico e mineral, fosfato bicálcico, aditivo antioxidante, calcário, calcítico, farinha de peixe, cloreto de colina e alfafa desidratada.

AIN-93: amido de milho, amido dextrinizado, sacarose, caseína e L cistina, óleo de soja, fibras, bitartarato de colina, pré-mix mineral e vitamínico e tert butihidroquinona.

Tabela 7 - Quantidade de micronutrientes e metais presente nas rações

	Controle	AIN-93
Arsênio	—	—
Boro (mg/kg)	14	6,0
Cálcio (mg/kg)	16000	6000
Cobre (mg/kg)	35	7
Cromo (mg/kg)	2,9	2,0
Cobalto (mg/kg)	1,4	0,01
Cádmio (mg/kg)	0,01	0,007
Chumbo (mg/kg)	0,1	0,1
Enxofre (mg/kg)	240	270
Fósforo (mg/kg)	9300	3500
Ferro (mg/kg)	271	83
Manganês (mg/kg)	115	9,0
Magnésio (mg/kg)	290	500
Molibdênio (mg/kg)	2,0	0,02
Mercúrio	0,04	0,06
Níquel (mg/kg)	1,8	1,0
Potássio (mg/kg)	12000	4000
Selênio (mg/kg)	0,096	0,15
Silício (mg/kg)	2,0	1,6
Zinco (mg/kg)	370	58

Tabela 8 - Comparação entre nutrientes presentes na formulação da AIN-93 original e AIN-93 preparada para este estudo.

	AIN-93	AIN-93 original
Carboidrato (%)	61,2	63,8
Lípídeo (%)	6,5	7
Proteína (%)	20,5	20
Cálcio (mg/kg)	6000	5000
Fósforo (mg/kg)	3500	3000
Manganês (mg/kg)	9,0	10
Magnésio (mg/kg)	500	513
Potássio (mg/kg)	4000	3600
Cobre (mg/kg)	7	6
Ferro (mg/kg)	83	45
Zinco (mg/kg)	58	38
Selênio (mg/kg)	0,15	0,18
Molibdênio (mg/kg)	0,02	0,1
Silício (mg/kg)	1,6	5,0
Cromo (mg/kg)	2,0	1,0
Boro (mg/kg)	6,0	0,5
Enxofre (mg/kg)	270	300
Cobalto (mg/kg)	0,01	—
Cádmio (mg/kg)	0,007	—
Chumbo (mg/kg)	0,1	—
Níquel (mg/kg)	1,0	0,5
Mercúrio	0,06	—
Arsênio	—	—

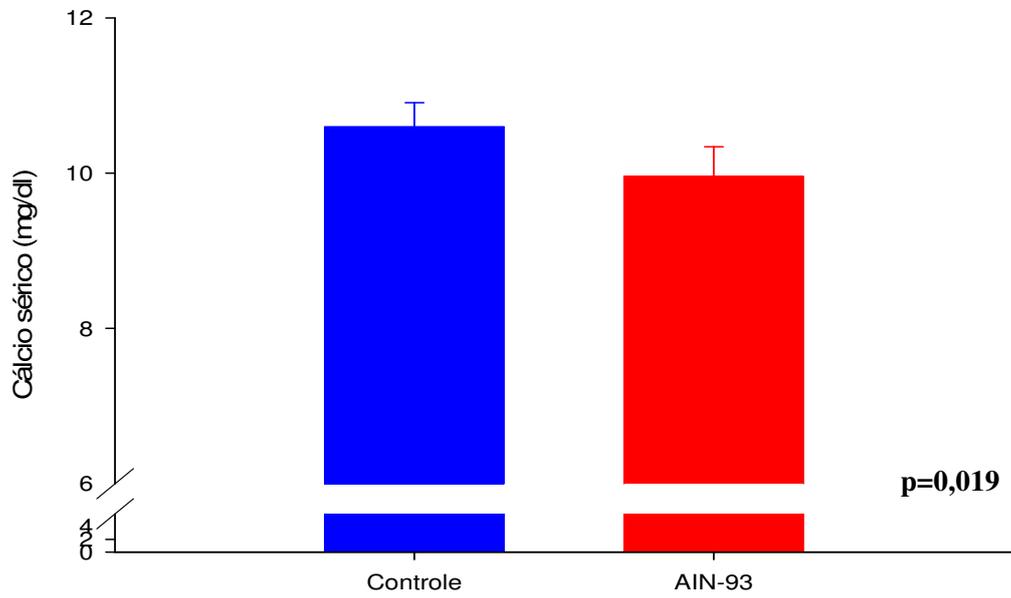


Figura 1 - Cálcio sérico dos grupos controle e AIN-93 antes do infarto.

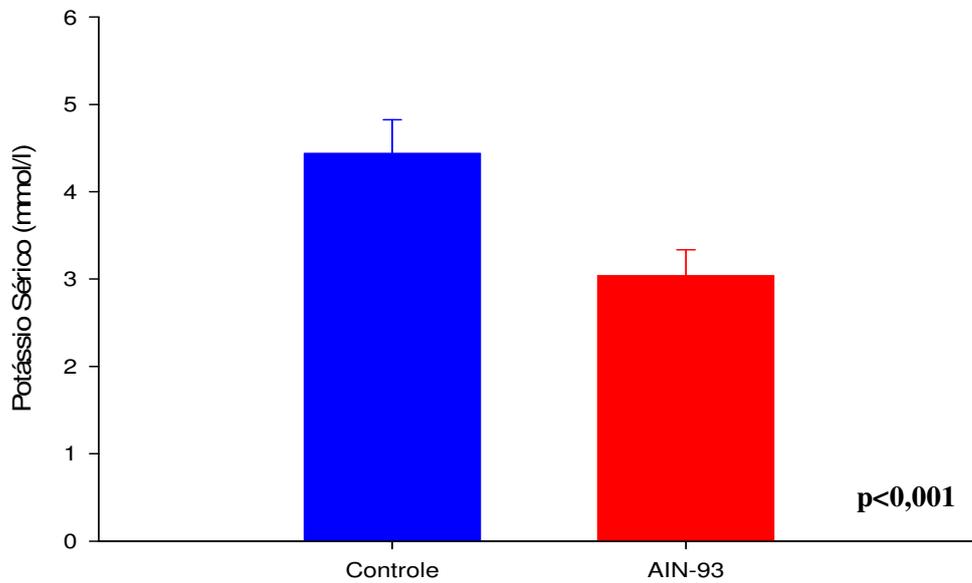


Figura 2 - Potássio sérico dos grupos controle e AIN-93 antes do infarto.

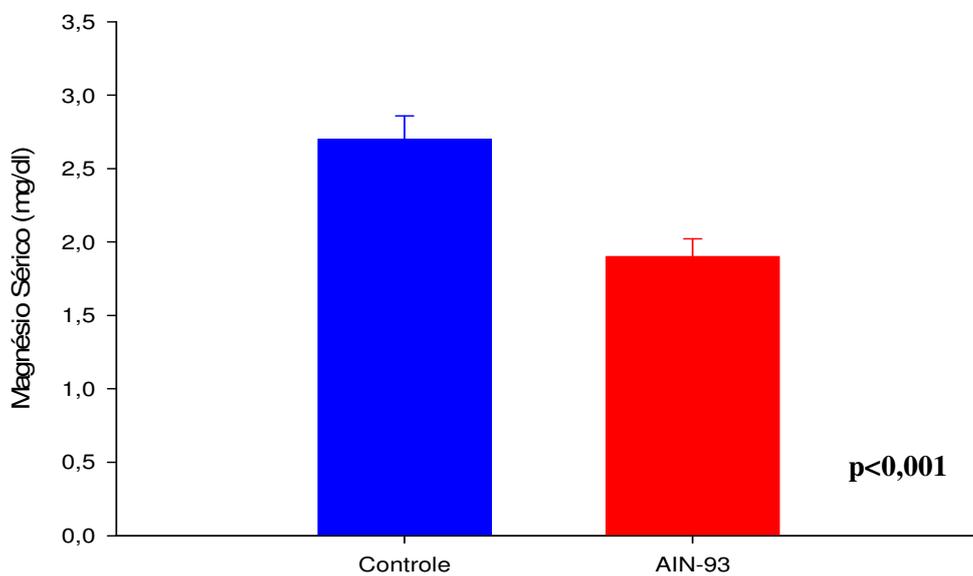


Figura 3 - Magnésio sérico dos grupos controle e AIN-93 antes do infarto.

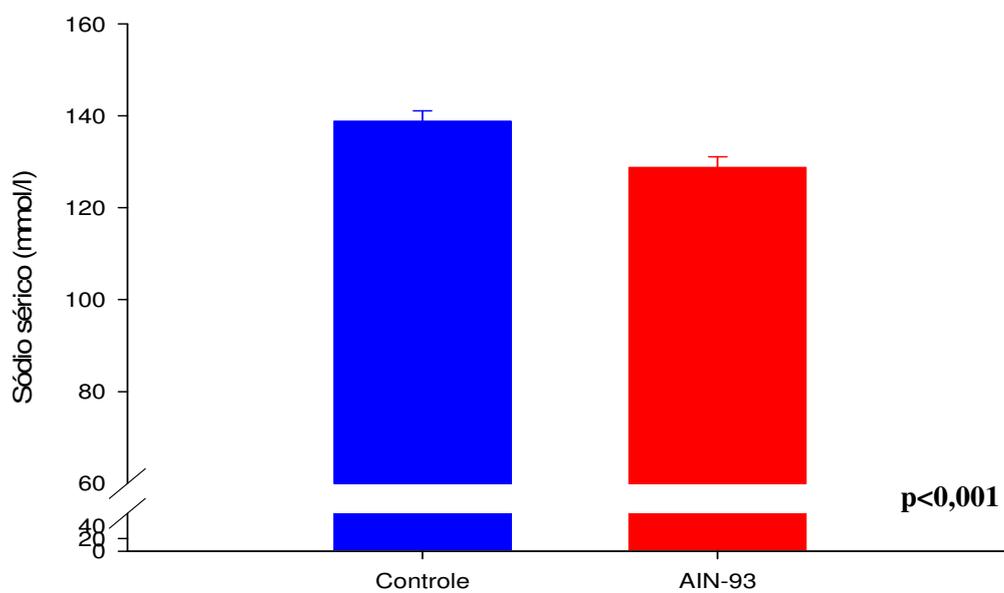


Figura 4 - Sódio sérico dos grupos controle e AIN-93 antes do infarto.

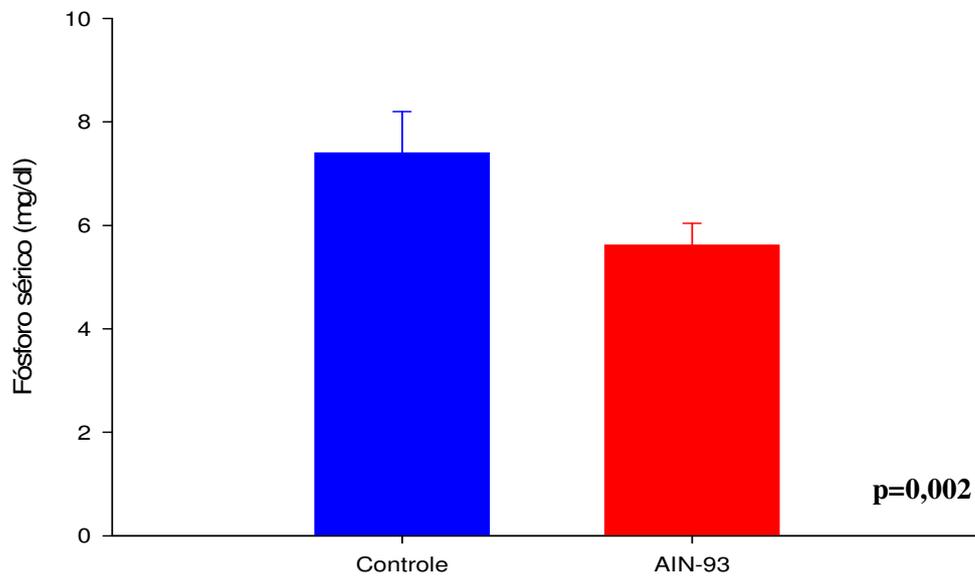


Figura 5 - Fósforo sérico dos grupos controle e AIN-93 antes do infarto.

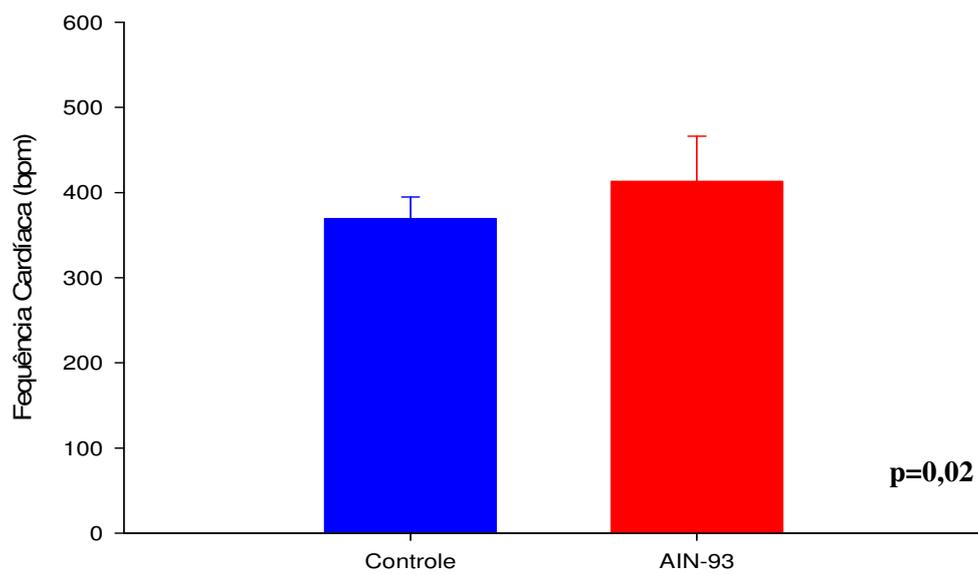


Figura 6 - Frequência cardíaca dos grupos controle e AIN-93 antes do infarto.

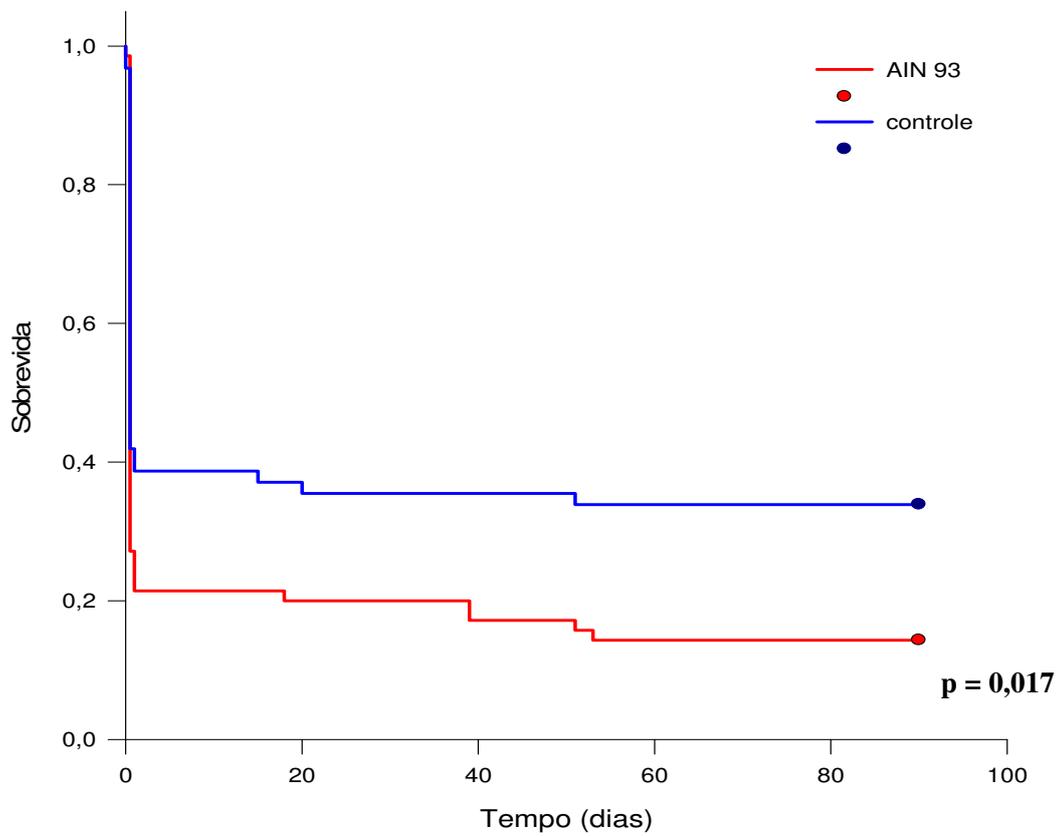


Figura 7 - Sobrevivida dos grupos controle e AIN-93 após o infarto.

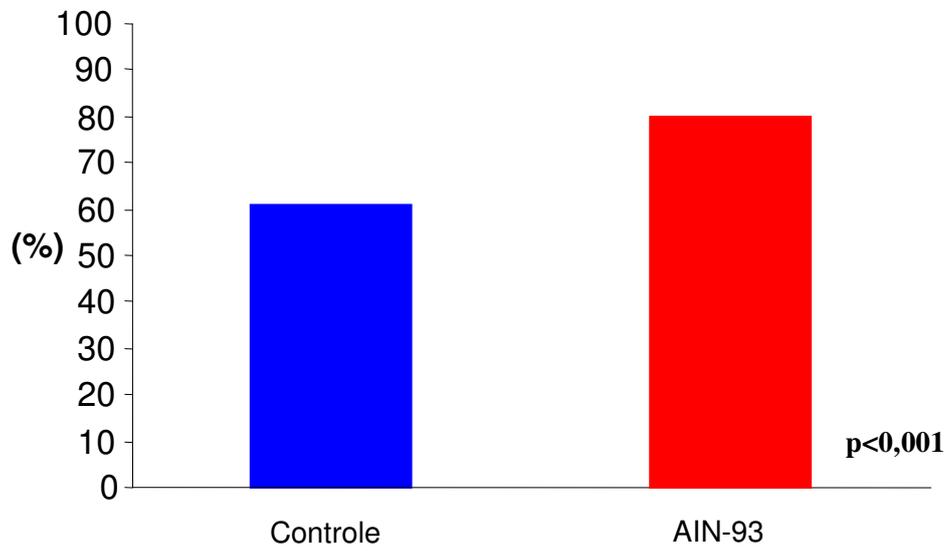


Figura 8 - Porcentagem de mortalidade nas primeiras 24hs pós IAM.

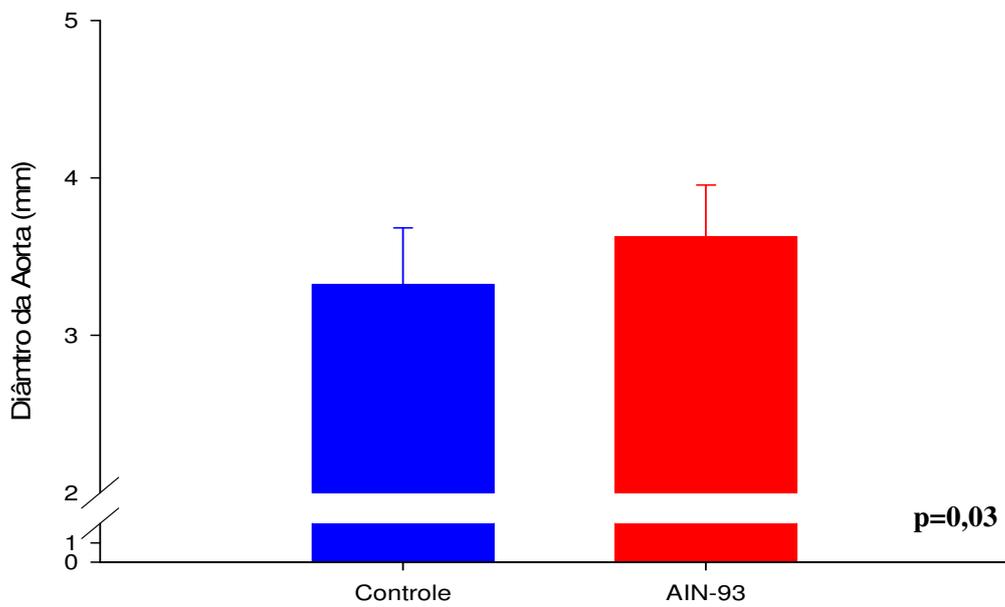


Figura 9 - Diâmetro da aorta dos grupos controle e AIN-93 após o IAM.

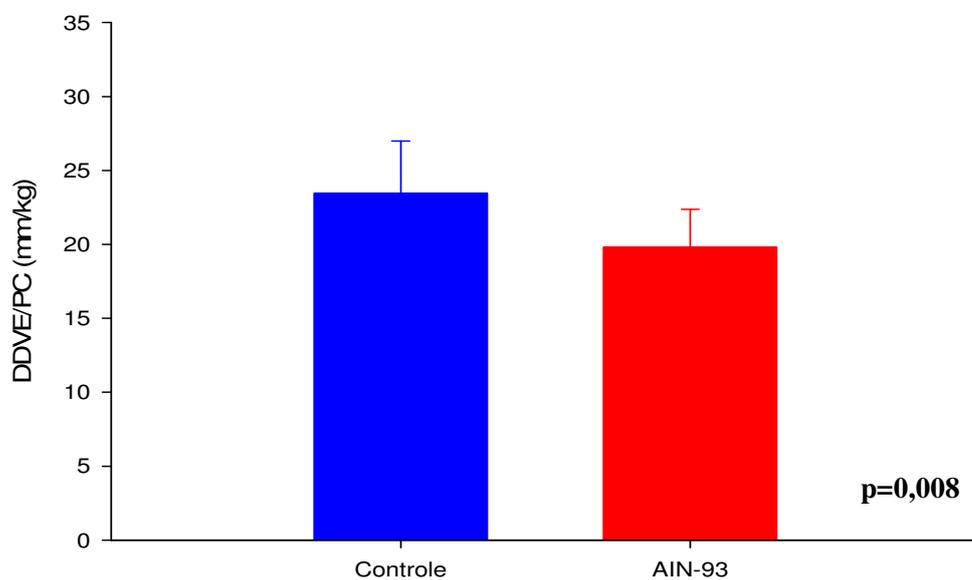


Figura 10 - Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo pelo peso, nos grupos controle e AIN-93 após o IAM.

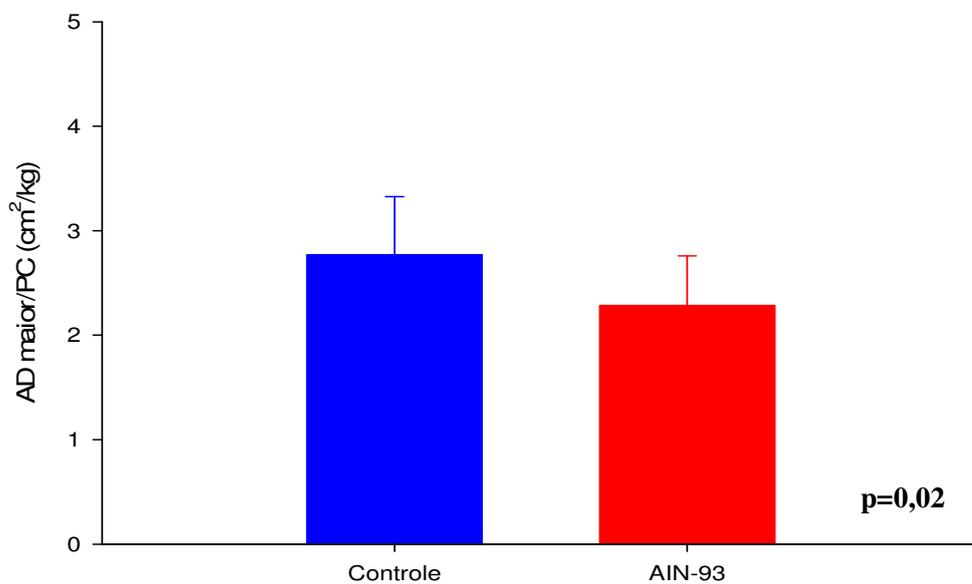


Figura 11 - Área diastólica do ventrículo esquerdo no eixo maior (AD maior) corrigido pelo peso, nos grupos controle e AIN-93.

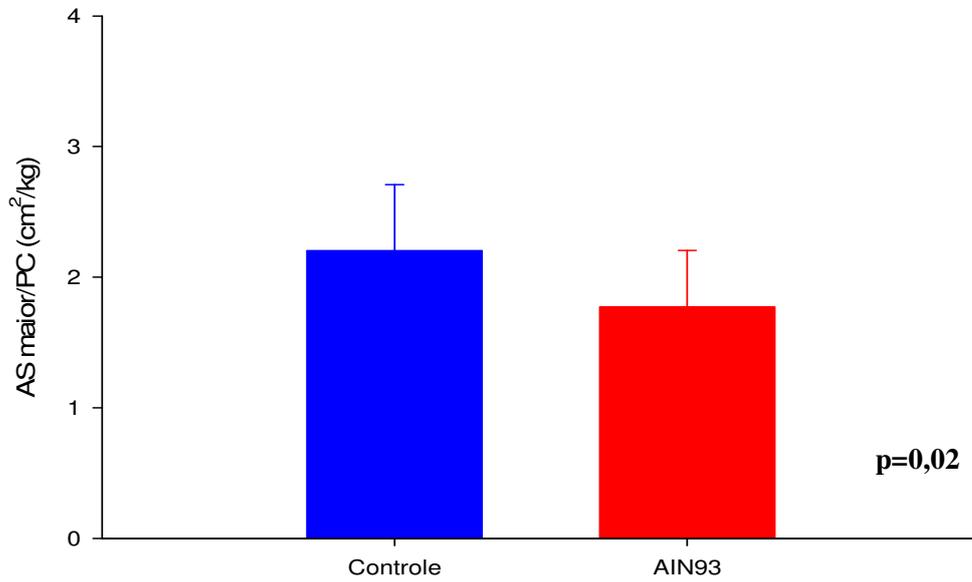


Figura 12 - Área sistólica do ventrículo esquerdo no eixo maior (AS maior) corrigida pelo peso, nos grupos controle e AIN-93.

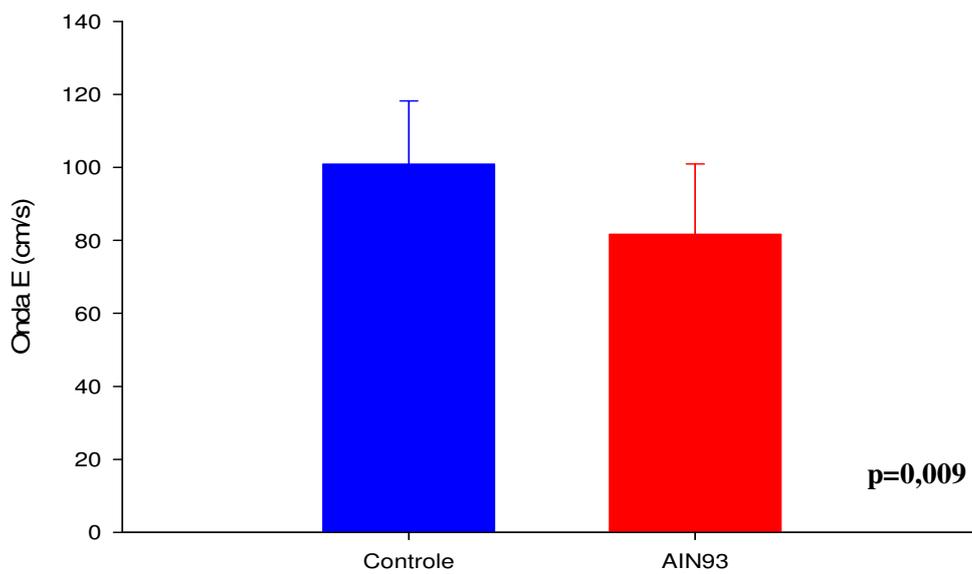


Figura 13 - Onda E dos grupos controle e AIN-93.

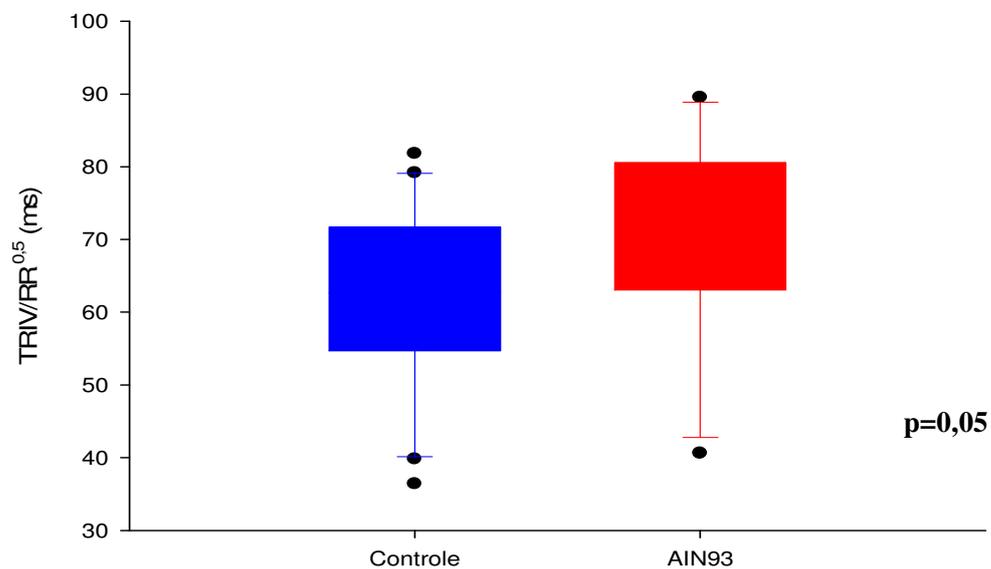


Figura 14 - O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), ajustado pela frequência cardíaca dos grupos controle e AIN-93.

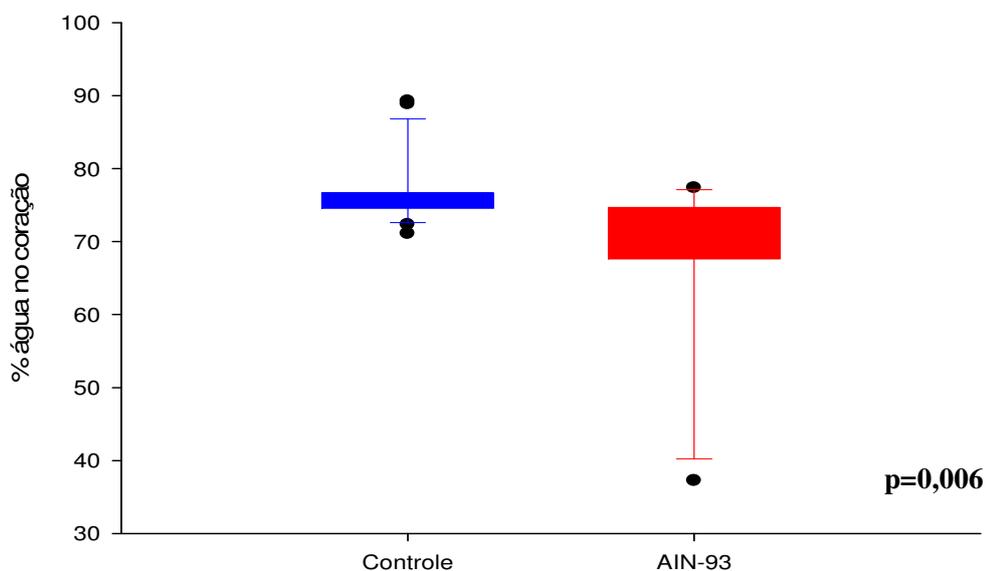


Figura 15 - Teor de água do coração após IAM, nos grupos controle e AIN-93.

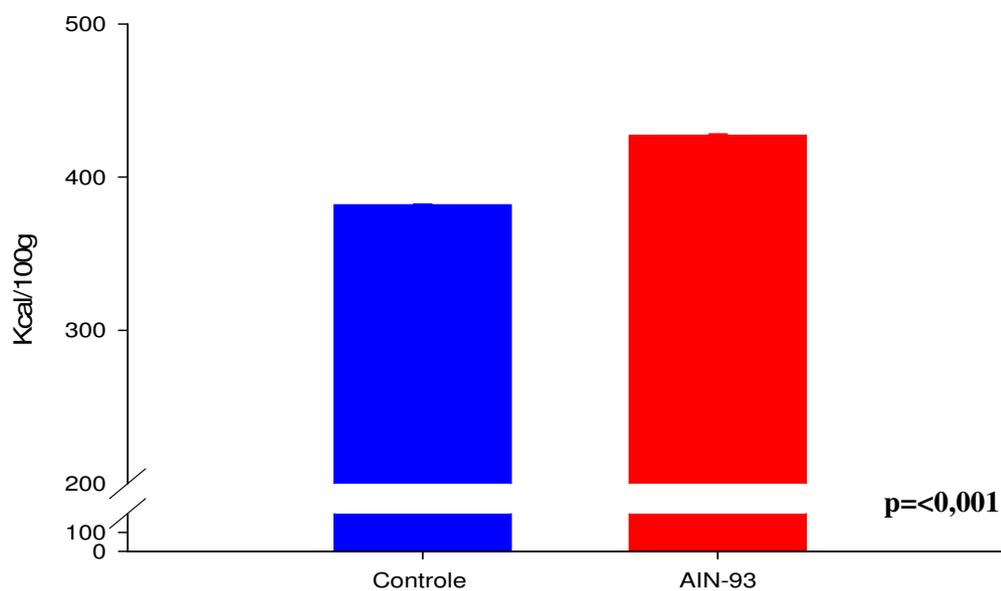


Figura 16 - Quantidade calórica presente nas rações controle e AIN-93.

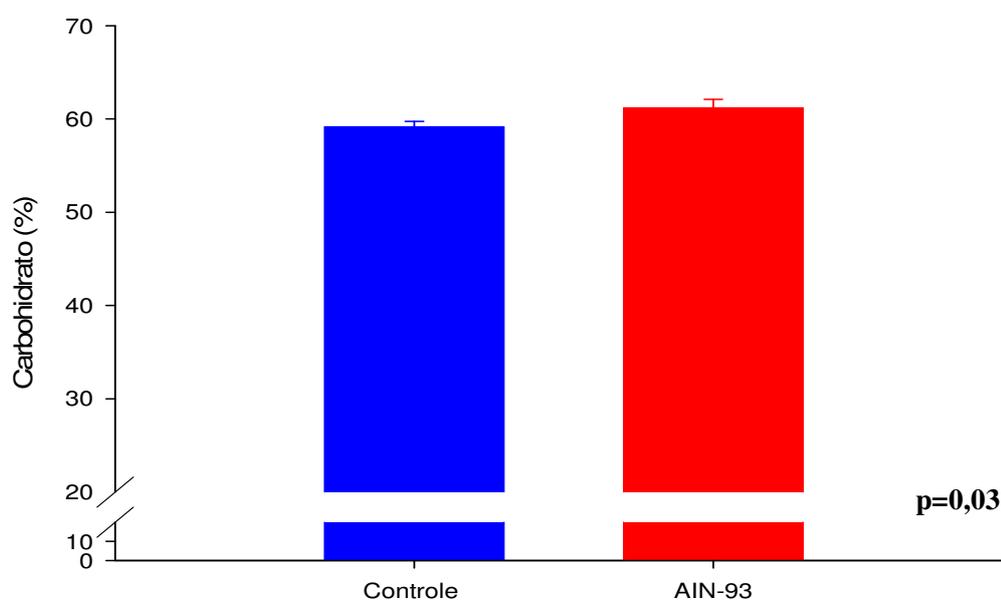


Figura 17 - Quantidade de Carbohidrato presente nas rações controle e AIN-93.

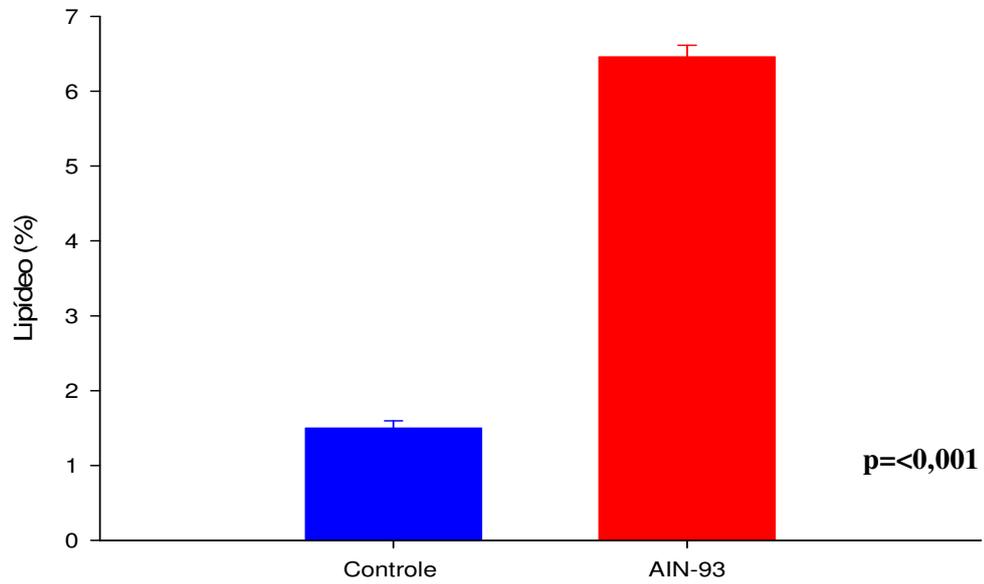


Figura 18 - Quantidade de lipídio presente nas rações controle e AIN-93.

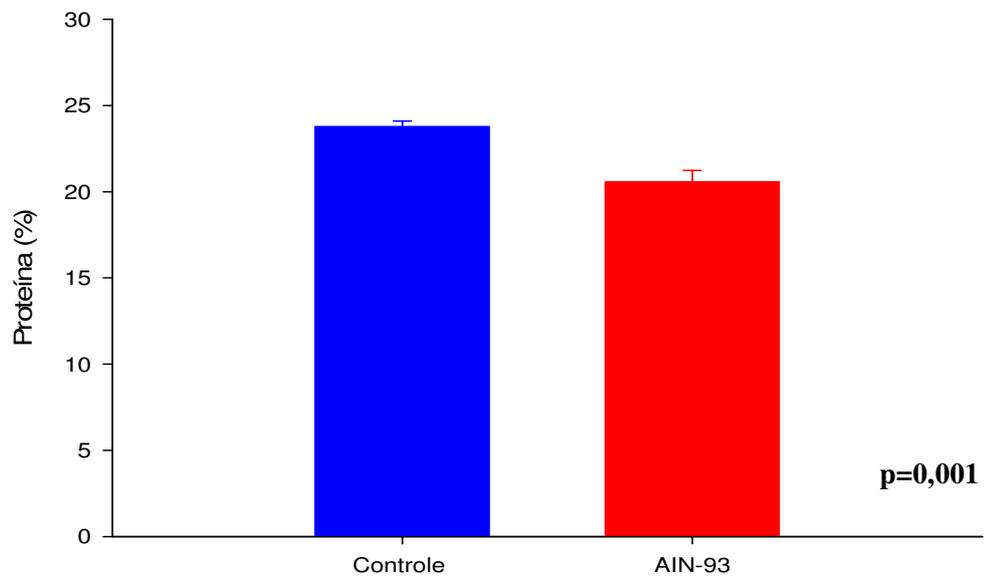


Figura 19 - Quantidade de proteína presente nas rações controle e AIN-93.

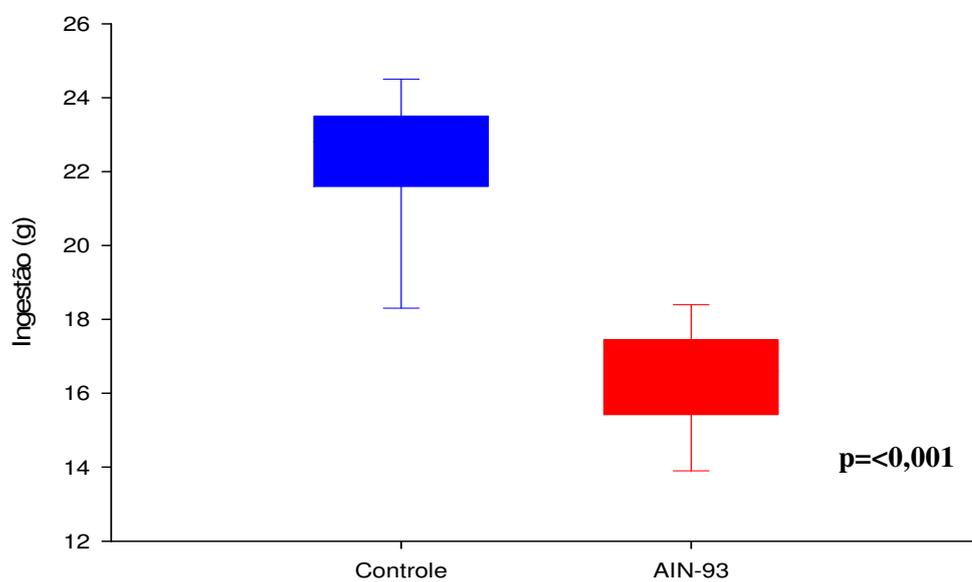


Figura 20 - Ingestão por caixa dos grupos controle e AIN-93 após IAM.

6. Discussão

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da dieta AIN-93 na mortalidade e no processo de remodelação cardíaca após o infarto experimental. Nossos resultados mostram que imediatamente após o infarto, o consumo da dieta AIN-93 foi acompanhado por aumento da mortalidade. Após o período de três meses, entretanto, a dieta AIN-93 resultou em atenuação do processo de remodelação em comparação à dieta controle.

O primeiro aspecto a ser considerado em nosso trabalho é a justificativa para o estudo da dieta AIN-93. A dieta utilizada nesta pesquisa foi proposta pelo Instituto Americano de Nutrição, com objetivo de estabelecer um guia que ajudasse os cientistas na pesquisa experimental nutricional⁽¹⁶⁾. Inicialmente, todos os constituintes e as quantidades exatas de nutrientes que fazem parte dessa ração são conhecidos. Por essa razão, essa dieta poderia ser padronizada nas pesquisas entre diferentes laboratórios com a intenção de uniformizar interpretações de resultados, já que as dietas comercializadas nem sempre possuem o mesmo padrão de nutrientes e isso poderia interferir nos resultados das pesquisas. Em segundo lugar, por ter sua composição definida, a dieta AIN-93 permite manipulação dos seus componentes, com a possibilidade de adição ou subtração de determinado nutriente como, por exemplo, restrição dietética de vitaminas.

Nosso estudo, utilizando o modelo de infarto experimental em ratos, analisou os efeitos do consumo da dieta AIN-93 em comparação com o consumo de dieta controle que, neste caso, foi a Labina, na mortalidade e em variáveis morfológicas e funcionais cardíacas.

Em relação aos constituintes das rações, a comparação entre as dietas mostrou diferenças significativas nos macro e micronutrientes. Em relação aos macronutrientes, avaliados por meio da análise centesimal feita nas duas rações utilizadas neste estudo, é possível concluir que a dieta AIN-93 possui maior quantidade de calorias, carboidrato e lipídios e menor quantidade de proteínas do que a dieta controle. Outra diferença observada refere-se ao fato de que a dieta AIN-93 é constituída de carboidrato simples (sacarose) e composto (amido de milho), proteína animal e lipídio vegetal. Já a ração controle é composta de carboidrato complexo (farelos), lipídio e proteína vegetal. Em

relação aos micronutrientes, a quantidade da maioria dos micronutrientes da dieta AIN-93 foi inferior à quantidade da dieta controle. Esse fato ocorreu apesar da constituição presente na AIN-93 estar de acordo com a quantidade preconizada na sua formulação⁽¹⁶⁾ (Tabela 8). Vale ressaltar que dietas com constituintes purificados possuem menor quantidade de eletrólitos, apesar da inclusão de mix-minerais. Esse fato é resultado de que constituintes não purificados também são fontes de micronutrientes.

Outro aspecto a ser considerado é que, no modelo do infarto experimental, a diferença da dieta AIN-93 nos micro e nos macronutrientes em relação à dieta controle pode ter relevância clínica.

Considerando os efeitos das dietas na mortalidade após o infarto, a dieta AIN-93 foi associada à maior mortalidade em relação à dieta controle, durante todo o período de observação. A maior taxa de mortalidade, entretanto, ocorreu nas primeiras 24 horas após o IAM e, nesse período, a mortalidade também foi significativamente maior com a dieta AIN-93. Nessa fase precoce, a principal causa de morte são as arritmias, principalmente taquicardia ventricular sustentada e fibrilação ventricular⁽³²⁾.

Em relação aos potenciais mecanismos envolvidos nessa maior mortalidade precoce após o infarto, esse fenômeno pode ser resultado das conseqüências da ingestão da dieta AIN-93 na prevalência e gravidade das arritmias, modulado pelas alterações nas concentrações de micronutrientes. Essa hipótese se baseia no fato de que, no modelo do rato, Opitz e colaboradores encontraram mortalidade de 65% nas 48 horas após o infarto. Por meio de monitoração contínua, os autores mostraram que 96% dos animais submetidos ao IAM apresentaram centenas de episódios de taquicardia ventricular e ao menos 20 episódios de fibrilação ventricular. Adicionalmente, foram evidenciados dois períodos distintos de arritmia⁽³²⁾. O primeiro período incluiu os primeiros 30 minutos após a oclusão coronariana. Nessa fase, alterações iônicas são relevantes, já que diversos fatores, como por exemplo, a própria isquemia e a elevação na secreção de adrenalina, podem elevar a concentração de potássio extracelular. Em conseqüência, as células do centro da isquemia tornam-se mais excitáveis. O segundo período de arritmia, responsável por 65% dos óbitos,

incluiu o período entre 1,5 e 9 horas após o infarto. Nesse período, a origem das arritmias parece ser uma interface entre as células mortas e as células ainda viáveis, favorecendo o surgimento de arritmias pelo fenômeno de re-entrada⁽³²⁾.

Os animais de nosso estudo alimentados com a dieta AIN-93 apresentaram níveis mais baixos de potássio que os animais controle no momento do infarto. Assim, existe a possibilidade de que esse fenômeno possa ter contribuído para o aparecimento de arritmias. Adicionalmente, já está bem estabelecido na literatura que a excitabilidade do miocárdio depende da concentração de outros eletrólitos, incluindo: fósforo, sódio, magnésio e cálcio. Em consequência, as variações nas concentrações desses micronutrientes podem resultar em alterações na excitabilidade do miocárdio e predispor o aparecimento de arritmias malignas. Como exemplo da importância dos micronutrientes, na prática clínica, a suplementação de potássio em pacientes infartados e com hipocalcemia reduziu a incidência de fibrilação ventricular. A suplementação de magnésio também pode ser necessária, já que isto pode estar associada com diminuição de arritmias pós-IAM. Adicionalmente, estudos clínicos mostram que a diminuição sérica do fósforo, associado ao infarto agudo do miocárdio, foi um significativo preditor de taquicardia ventricular durante as primeiras 24 horas de hospitalização. Já a hipocalcemia, *per se*, raramente causa arritmia, mas cronicamente pode estar associada à insuficiência cardíaca⁽³³⁾.

Pelo exposto, em nosso estudo, o fenômeno de arritmias cardíacas pode ter sido intensificado nos animais alimentados com AIN-93, com consequente aumento na mortalidade na fase aguda, já que houve menor quantidade de diversos eletrólitos séricos quando comparados com o grupo controle. Vale ressaltar, ainda, que as quantidades desses eletrólitos estavam abaixo dos níveis séricos de referência para essa espécie de animais.

Considerando os efeitos das dietas na mortalidade na fase crônica do infarto, após as primeiras 24 horas da oclusão coronariana, podemos observar que a sobrevivência com a dieta AIN-93 foi semelhante à da dieta controle. Na fase crônica pós-IAM, a mortalidade encontrada nesse modelo é extremamente variável, sendo que o principal determinante desse evento é o tamanho do infarto. Nesse sentido, Pfeffer e colaboradores, acompanhando

animais infartados por período de um ano, verificaram que para infartos pequenos (5-19,9% do ventrículo esquerdo), moderados (20-39,9%) e grandes (\geq 40%), as taxas de mortalidade ficaram ao redor de 50%, 75% e 85%, respectivamente⁽²⁾. Aceita-se que, nesse período, o principal mecanismo envolvido na mortalidade é o processo de remodelação cardíaca, associado à presença de disfunção ventricular⁽²⁾.

Remodelação cardíaca pode ser definida como alterações genéticas, que resultam em modificações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas. Essas alterações podem se manifestar clinicamente como alterações de volume, massa, constituição, geometria e/ou de função cardíaca⁽¹⁻³⁾. Apesar da extrema complexidade do processo de remodelação ventricular, esse termo, após o infarto do miocárdio, é freqüentemente utilizado como sinônimo de crescimento celular, detectado pelo aumento da cavidade ventricular^(8,34). Um aspecto relevante desse processo refere-se ao fato de que a remodelação ventricular pós-infarto do miocárdio está associada à pior prognóstico, pois sua presença e intensidade estão relacionadas com fibrose, disfunção ventricular progressiva, arritmias e maior mortalidade⁽⁴⁾.

Em nosso trabalho, os animais alimentados com a dieta AIN-93 apresentaram menor cavidade ventricular esquerda, avaliada pelas variáveis DDVE, AD e AS corrigidos pelo PC, em relação aos animais alimentados com a dieta controle. Adicionalmente, houve forte tendência da dieta AIN-93 resultar em menor quantidade de colágeno intersticial nas regiões não infartadas do ventrículo esquerdo. Portanto, o conjunto dos nossos resultados permite a afirmação de que o uso da dieta AIN-93 foi associada com atenuação do processo de remodelação pós-infarto, em comparação ao uso da dieta Labina.

Essas variações estruturais foram associadas a pequenas mudanças nos índices de função sistólica ou diastólica obtidos por meio do Dopplerecardiograma. A função diastólica foi avaliada por meio do padrão do fluxo transvalvar mitral, mais especificamente, as velocidades E e A.

A onda E representa o fluxo inicial pela válvula mitral e é modulado pelas pressões no átrio e ventrículo esquerdos, nessa fase do enchimento ventricular a onda A representa o pico de velocidade do fluxo durante a

contração atrial. Usualmente, as alterações características de disfunção diastólica são a inversão da relação E/A e, posteriormente, o aumento da onda E, caracterizando padrão restritivo⁽³⁵⁾. Outra variável utilizada é o TRIV, que corresponde ao tempo entre o fechamento da válvula aórtica e a abertura da mitral. O TRIV aumenta com a piora do relaxamento e diminui quando a complacência do ventrículo esquerdo está diminuída⁽³⁶⁾. Assim, o grupo AIN-93 apresentou melhor função diastólica em comparação aos animais do grupo controle. Vale ressaltar que o grau de disfunção diastólica apresentado pelo grupo alimentado com dieta controle é classificado como padrão restritivo. Este padrão é caracterizado por aumento na onda E, seguido por diminuição da onda A e diminuição do TRIV/RR^(0,5). Apesar de não haver diferença entre a relação E/A entre os grupos, o grupo controle apresentou maior onda E e menor TRIV/RR^(0,5). Portanto, a atenuação das alterações morfológicas causadas pelo consumo da dieta AIN-93 foi acompanhada por atenuação da disfunção diastólica pós-infarto. Aceita-se que a quantidade de colágeno intersticial seja um dos principais determinantes da função diastólica. Assim, a prevenção do acúmulo de colágeno intersticial poderia ser um dos mecanismos que contribuíram para a melhora da função diastólica nos animais alimentados com a dieta AIN-93.

Em relação à análise da função sistólica, os métodos utilizados em nosso estudo foram a fração de variação de área, o volume sistólico e o débito cardíaco. Os dados mostram que não houve diferença estatística entre os grupos. Pelo exposto, é possível concluir que o grupo alimentado com a ração AIN-93 não apresentou diferenças na função cardíaca sistólica em relação aos animais controle. Adicionalmente, a ausência de diferenças na função sistólica poderia explicar a mortalidade igual entre os dois grupos na fase crônica do infarto.

A influência da dieta na morfologia e na função cardíaca vem sendo estudada há algum tempo, em condições fisiológicas e em situações de agressão. Pelas evidências disponíveis até a presente data, os efeitos dos diferentes tipos de dieta podem ser modulados pelos macronutrientes.

Os mecanismos de ação dos macronutrientes na remodelação cardíaca não estão completamente elucidados, mas acredita-se que se a dieta for rica em carboidratos, principalmente os carboidratos simples, ocorre um

aumento nos níveis de insulina plasmática. Em consequência, ocorre a estimulação dos receptores de insulina nos cardiomiócitos, induzindo vias de sinalização intracelulares e à remodelação ^(36,37). Interessante notar que essa relação entre insulina e hipertrofia ventricular também foi observada em estudos clínicos ^(38,39). Outro potencial estimulador do processo de remodelação, com essa dieta, poderia ser a leptina. Por outro lado, dietas ricas em lipídios estimulariam a ação dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR), o qual regulam a ação da enzima de oxidação do ácido graxo na mitocôndria do miócito. Assim, dietas ricas em ácidos graxos atuariam como sinalizadores, mantendo ativado o PPAR e, conseqüentemente, a oxidação dos ácidos graxos. Desse modo, o coração lesado continuaria a priorizar os ácidos graxos como fonte de energia, a exemplo do que ocorre no coração normal. Adicionalmente, apesar de controverso, a ativação do PPAR poderia atenuar a remodelação secundária a diferentes estímulos, diminuindo a expressão de mediadores inflamatórios, a hipertrofia e a fibrose intersticial ⁽⁴⁰⁻⁴¹⁾.

Exemplificando o papel dos lipídios na remodelação cardíaca, achados experimentais mostram que dietas ricas em gorduras (45-60% da energia total da dieta) e pobres em carboidratos (20%) reduziram a remodelação em corações submetidos à sobrecarga de pressão ⁽⁴²⁾. Okere e colaboradores mostraram que em ratos Dahl sal sensíveis (DSS), alimentados com dieta rica em lipídio e sal, houve prevenção da hipertrofia em resposta à hipertensão arterial. Adicionalmente, houve aumento da performance contrátil quando comparado com o grupo que recebeu dieta padrão e sal ⁽⁴²⁾. Em outra publicação mais recente, o mesmo grupo mostrou que ratos DSS alimentados com dieta padrão apresentaram diminuição na fração de ejeção, aumento na massa e na área seccional de miócito, acompanhado de aumento no diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo, quando comparados com o grupo com dieta com alto teor de lipídeos ⁽⁴³⁾.

Outro aspecto a ser considerado é que, além da quantidade de gordura, a qualidade da gordura oferecida pela dieta também pode ser relevante para a remodelação. Assim, em estudo cujo objetivo foi comparar os efeitos de dieta rica em lipídio saturado, lipídio insaturado e dieta padrão em ratos DSS, os

animais alimentados com dieta com gordura insaturada tiveram menores níveis de insulina e leptina, quando comparados com os dois outros grupos. Devemos considerar que esses hormônios, como discutido anteriormente, podem afetar o metabolismo cardíaco e a pressão arterial e, potencialmente, regular a remodelação cardíaca. Em consonância com essa hipótese, o grupo com dieta composta por lipídio insaturado apresentou menores níveis de ceramidas, acompanhado de menor frequência de apoptose dos cardiomiócitos, quando comparado com o grupo alimentado com gordura saturada⁽⁴⁴⁾.

Considerando a participação dos carboidratos no processo de remodelação cardíaca, Sharma e colaboradores investigaram o efeito, na mortalidade e na função cardíaca, do consumo das seguintes dietas: rica em carboidrato complexo, rica em açúcar simples, rica em lipídios e ocidental (rica em lipídeo e açúcar) em ratos DSS. Esse estudo observou que, apesar de níveis similares de hipertensão em todos os grupos, a mortalidade nos grupos com dieta ocidental, carboidrato complexo e açúcar simples foi de 18%, 30% e 85% respectivamente. No grupo alimentado com dieta rica em lipídio não houve mortalidade. Adicionalmente, o grupo rico em açúcar simples apresentou maior espessura da parede do VE, compatível com maior hipertrofia, comparado com os demais grupos⁽⁴⁵⁾. Outro estudo, em ratos com sobrecarga de pressão, ao comparar os efeitos de dieta rica em carboidrato simples, dieta rica em amido e dieta padrão, observou que a dieta rica em frutose aumentou a massa, o diâmetro sistólico e diastólico final e diminuiu a fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Adicionalmente, o grupo com a dieta rica em frutose apresentou mortalidade de 54%, comparado com mortalidade de 8% e 29% nos grupos amido e padrão, respectivamente⁽⁴⁶⁾.

Pelo exposto, as evidências acumuladas até o momento permitem a afirmação de que os macronutrientes podem modular o processo de remodelação cardíaca em diferentes modelos de agressão cardíaca.

Em nosso estudo, o grupo alimentado com a dieta AIN-93 apresentou atenuação da remodelação e da disfunção cardíaca após o infarto experimental. Em relação aos macronutrientes, a dieta AIN-93 apresenta maior quantidade de lipídios, carboidratos e menor quantidade de proteínas que a

dieta controle. Assim, não é possível a identificação do fator responsável pelos efeitos da dieta AIN-93 na morfologia e função cardíaca. No entanto, possível explicação para o efeito protetor conferido por essa dieta seria a maior quantidade de lipídio na sua formulação, apesar da gordura presente na AIN-93 não superar a quantidade de carboidratos. Ademais, o lipídio que compõe a dieta AIN-93 é o insaturado, o qual parece ter melhor efeito na manutenção da morfologia e função cardíaca.

Em conclusão, os ratos alimentados com a dieta AIN-93 apresentaram maior mortalidade durante as primeiras 24 horas após o infarto, provavelmente em consequência do menor nível de eletrólitos séricos. De outro modo, na fase crônica do infarto, a ração AIN-93 atenuou o processo de remodelação, provavelmente em consequência de diferenças na constituição dos macronutrientes.

7. Resumo

O objetivo do nosso estudo foi avaliar a influência da dieta AIN-93 na mortalidade e no processo de remodelação cardíaca após o infarto agudo do miocárdio em ratos. **Métodos:** foram utilizados ratos Wistar, machos, que após o desmame foram divididos em dois grupos: grupo controle (n =62), o qual recebeu dieta padrão de nosso laboratório (Labina) e grupo AIN-93 (n=70), que recebeu a dieta AIN-93. Ao atingirem peso ao redor de 250g, os ratos foram submetidos ao infarto experimental; em alguns animais foi feita coleta de sangue. Após 3 meses de acompanhamento, os animais foram submetidos à estudo funcional e morfométrico. Para a análise estatística foram utilizados o teste de Mann-Whitney, *t* de Student, χ^2 , curva de Kaplan Méier e log-rank. O nível de significância adotado foi 5%. **Resultados:** não foram observadas diferenças significantes entre os grupos em relação ao peso no momento do infarto e em relação ao tamanho do infarto (C = 29,7 ± 17,2%; AIN-93 = 32,6 ± 18,4%; p = 0,677). A mortalidade durante nas primeiras 24hs e após 3 meses do infarto foi significativamente maior no grupo AIN-93 (C = 61%; AIN-93 = 80%; p < 0,001) e (C = 66%; AIN-93 = 85,7%; p = 0,017), respectivamente. O Grupo AIN-93 apresentou maior diâmetro da aorta (C = 3,3 ± 0,3 mm; AIN-93 = 3,6 ± 0,3 mm; p=0,03). Por outro lado, o DDVE/PC (C = 23,9 ± 3,6 mm/kg; AIN-93 = 20,2 ± 2,6 mm/kg; p=0,008), as AD/PC (C = 2,7 ± 0,5 cm²/kg; AIN-93 = 2,2 ± 0,4 cm²/kg; p=0,02) e AS/PC (C = 2,2 ± 0,5 cm²/kg; AIN-93 = 1,7 ± 0,4 cm²/kg; p=0,02), no eixo maior, foram menores no grupo AIN-93 em comparação com C. Em relação às variáveis de função diastólica, a onda E foi menor (C = 100,9 ± 17,2 cm/s; AIN-93 = 81,7 ± 19,2 cm/s; p=0,009) e o TRIV/RR foi maior (C = 58 (55-70); AIN-93 = 66 (64-80); p=0,05) no grupo AIN-93, quando comparados com o grupo controle. O teor de água do coração foi menor no grupo AIN-93 do que no C (C = 75% (74-76); AIN93 = 73,7% (67-74); p=0,006), após 3 meses do infarto . Em relação ao conteúdo de colágeno, houve forte tendência do grupo AIN-93 apresentar menores valores que C (C = 4,4 (2,9 - 7,5) %; AIN93 = 2,9 (2,0 - 5,0) %; p=0,07). Não houve diferença entre os grupos em relação à função sistólica. Em relação aos eletrólitos séricos, os valores de Ca, K, Mg, Na e P foram menores no grupo AIN-93, quando comparados com o controle. Em relação aos constituintes da dieta, considerando os macronutrientes, a dieta AIN-93 apresentou maior quantidade calórica, de carboidratos e de lipídio e menor

quantidade de proteína, quando comparada com a ração Labina. Em relação aos micronutrientes, observa-se que os valores de Ca, K, e P foram menores na dieta AIN-93, quando comparada com a dieta Labina. Entretanto, a quantidade de Mg foi maior na dieta AIN-93. **Conclusões:** os ratos alimentados com a dieta AIN-93 apresentaram maior mortalidade durante todo período do experimento. Durante as primeiras 24 horas após o infarto, a maior mortalidade se deve, provavelmente, aos menores níveis de eletrólitos séricos. De outro modo, na fase crônica do infarto, a ração AIN-93 atenuou o processo de remodelação, provavelmente em consequência de diferenças na constituição dos macronutrientes.

8. Abstract

The objective of this study was to analyze the effects of AIN-93 diet on cardiac remodeling and mortality after myocardial infarction in rats. **Methods:** Wistar rats were utilized divided into two groups: control group (C, n=62), fed with Labina diet; and AIN-93 group (AIN-93, n=70). Around 250g, the animals were submitted to experimental myocardial infarction. After three months, the animals were submitted to echocardiogram, morphometric and biochemical analyzes. Statistical analyzes utilized the following tests: Mann-Whitney, *t* de Student, χ^2 , Kaplan Méier curve and log-rank. The significance level was 5%. **Results:** There were no differences in body weight and infarct size (C = 29.7 ± 17.2%; AIN-93 = 32.6 ± 18.4%; p = 0.677) between the groups. The mortality during the first 24h (C = 61%; AIN-93 = 80%; p < 0.001) and after three months (C = 66%; AIN-93 = 85.7%; p = 0.017) was higher in AIN-93 than C. AIN-93 presented higher aortic diameter (C = 3.3 ± 0.3 mm; AIN-93 = 3.6 ± 0.3 mm; p=0.03). On the other hand, adjusted left ventricular diastolic diameter (C = 23.9 ± 3.6 mm/kg; AIN-93 = 20.2 ± 2.6 mm/kg; p=0.008), adjusted diastolic (C = 2.7 ± 0.5 cm²/kg; AIN-93 = 2.2 ± 0.4 cm²/kg; p=0.02) and systolic (C = 2.2 ± 0.5 cm²/kg; AIN-93 = 1.7 ± 0.4 cm²/kg; p=0.02) areas in the long axis were smaller in AIN-93 than C. Considering the diastolic function variables, E wave was decreased (C = 100.9 ± 17.2 cm/s; AIN-93 = 81.7 ± 19.2 cm/s; p=0.009) and TRIV/RR increased (C = 58 (55-70); AIN-93 = 66 (64-80); p=0.05) in AIN-93 in comparison to C. The amount of water was smaller in AIN-93 than C (C = 75% (74-76); AIN93 = 73.7% (67-74); p=0.006). Considering the collagen amount, AIN-93 presented a strong tendency to smaller values than C (C = 4.4 (2.9 - 7.5) %; AIN93 = 2.9 (2.0 - 5.0) %; p=0.07). The serum values of Ca, K, Mg, Na e P were smaller in AIN-93 than C. The AIN-93 diet presented smaller amounts of protein, but higher values of carbohydrate, lipid, and calories. Considering the micronutrients, The AIN-93 diet presented smaller amounts of Ca, K and P, but higher values of Mg than C diet. **Conclusions:** animals of AIN-93 diet presented higher early mortality, probably due the smaller serum electrolytes. On the other hand, in chronic phase, AIN-93 diet attenuated the remodeling process, probably due the differences in amounts of macronutrients.

9. Referências Bibliográficas

1. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res.* 1985; 57: 84-95.
2. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990; 81:1161-72.
3. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35: 569-82.
4. Zornoff LAM, Cicogna AC, Paiva SAR, Spadaro J. Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. *Rev Soc Cardiol Estado São Paulo.* 2002; 12: 371-8.
5. Zornoff LAM, Spadaro J. Remodelação ventricular após infarto agudo do miocárdio: conceitos, fisiopatologia e abordagem terapêutica. *Arq Bras Cardiol.* 1997; 68: 453-60.
6. Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. História natural da remodelação miocárdica: da agressão aos sintomas. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.* 2000; 1: 8-16.
7. Bennet MR. Apoptosis in the cardiovascular system. *Heart.* 2002; 87: 480-7.
8. Swynghedauw R. Pathophysiology of chronic heart failure. *Physiol Rev.* 1999; 79: 215-62.
9. Weker KT. Cardioreparation in hypertensive heart disease. *Hypertension.* 2001; 38 (suppl 3): 588-91.
10. Zannad F, Dousset B, Alla F. Treatment of congestive heart failure: interfering the aldosterone-cardiac extracellular matrix relationship. *Hipertension* 2001; 38: 1227-32.
11. Weber KT, Sun Y, Guntaka RV. Rebuilding and remodeling following myocardial infarction: the good, the bad, and the ugly of tissue repair. *Dial Cardiovasc Med.* 1999; 4: 3-19.

12. Cleutjens JPM. The role of matrix metalloproteinases in the heart disease. *Cardiovasc Res.* 1996; 31: 816-21.
13. Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J. The role of the cytoskeleton in the heart failure. *Cardiovasc Res.* 2000; 45: 273-8.
14. Norton GR, Woodiwitss AJ, Gaasch WH, Mela T, Chung ES, Aurigemma GP, et al. Heart failure in pressure overload hypertrophy: the relative roles of ventricular remodeling and myocardial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39: 664-71.
15. Sharma N, Okere IC, Duda MK, Chess DJ, O'Shea KM, Stanley WC. Potential impact of carbohydrate and fat intake on pathological left ventricular hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2007; 73: 257-68.
16. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123: 1939-51.
17. Zornoff LA, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva SA, Spadaro J. Early rather than delayed administration of lisinopril protects the heart after myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol.* 2000; 95: 208-14.
18. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Frohlich ED. Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Lab Clin Med.* 1971; 78: 957-62.
19. Paiva SAR, Matsubara LS, Matsubara BB, Minicucci MF, Azevedo PS, Campana AO et al. Retinoic acid supplementation attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Nutr* 2005; 135: 2326-8.
20. Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. A exposição à fumaça do cigarro intensifica a remodelação ventricular após o infarto agudo do miocárdio. *Arq Bras Cardiol.* 2006, 86: 276-82.

21. Zornoff LA, Paiva SA, Matsubara BB, Matsubara LS, Spadaro J. Combination therapy with angiotensin converting enzyme inhibition and AT1 receptor inhibitor on ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2000; 5: 203-9.
22. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman AE. The Committee on M-Mode Standardization of the American Society of Echocardiography, Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation.* 1978; 58: 1072-83.
23. Solomon SD, Greaves SC, Rayan M, Finn P, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Temporal dissociation of left ventricular function and remodeling following experimental myocardial infarction in rats. *J Card Fail.* 1999; 5: 213-23.
24. Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebekk A, Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol.* 2000; 89:1445-54.
25. Spadaro J, Fishbein MC, Hare C, Pfeffer MA, Maroko PR. Characterization of myocardial infarcts in the rat. *Arch Pathol Lab Med.* 1980; 104: 179-83.
26. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol.* 2000; 279: 1534-9.
27. Doering CV, Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Aghili S, Abrahams C, et al. Collagen network remodeling and diastolic stiffness on the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 1998; 22: 686-95.
28. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. Official methods of analysis. Washington: Association of Official Agricultural Chemists. 937 p. 1984.
29. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo: IAL. 1985, v. 1, 371 p.

30. Food and Agriculture Organization. Food energy - methods of analysis and conversion factors [Technical paper, 77] Roma; Food and Agriculture Organization; 2003.
31. Malavolta E; Vitti GC; Oliveira SA. Avaliação do Estado nutricional de Plantas. Piracicaba: 1997. 306p.
32. Optiz CF, Mitchell GF, Pfeffer MA, Pfeffer MJ. Arrhythmias and death after coronary artery occlusion in the rat. *Circulation*. 1995; 92: 253-61.
33. Redman J, Worthley IG. Antiarrhythmic and haemodynamic effects of the commonly used intravenous electrolytes. *Crit Care and resusc*. 2001; 3: 22-34.
34. Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med*. 2001;110:375-465.
35. Lester SJ, Tajik AJ, Nishimura RA, Oh JK, Khandheria BK, Seward JB. Unlocking the mysteries of diastolic function. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 51: 679-89.
36. Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, Graveleau C, Young ME, Pham M, et al. Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest*. 2002; 109: 629-39.
37. Shiojima I, Yefremashvili M, Luo Z, Kureishi Y, Takahashi A, Tao J, et al. Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *J Biol Chem*. 2002; 277: 37670-7.
38. Davis CL, Kapuku G, Snieder H, Kumar M, Treiber FA. Insulin resistance syndrome and left ventricular mass in healthy young people. *Am J Med Sci*. 2002; 324: 72-5.
39. Ilercil A, Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, O'Grady MJ, Lee ET, et al. Association of insulin levels with left ventricular structure and function in American Indians: the strong heart study. *Diabetes*. 2002; 51: 1543-7.

40. Huss JM, Kelly DP. Nuclear receptor insuling and cardiac energetics. *Circ Res.* 2004; 95: 568-78.
41. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev.* 2005; 85: 1093-129.
42. Okere IC, Chess DJ, Mcelfresh TA, Johnson J, Rennison J, Ernsberger P, et al. Hight-fat diet prevents cardiac hypertrophy and improves contractile function in the hypertensive dahl salt-sensitive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005; 32: 825-31.
43. Okere IC, Young ME, McElfresh TA, Chess JD, Sharov VG, Sabbah HN, et al. Low carbohydrate/hight-fat diet attenuates cardiac hypertrophy, remodeling, and altered gene expression in hypertension. *Hypertension.* 2006; 48: 1116-23.
44. Okere IC, Chandler MP, McElfresh TA, Renninson JH, Sharov V, Sabbah HN, et al. Differential effects of saturated and unsaturated fatty acids diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291: H38- H44.
45. Sharma N, Okere IC, Duda MK, Johnson J, YuanCL, Chandler MP, et al. Hight fructose diet increase mortality in hypertensive rats compared to a complex carbohydrate or hight fat diet. *Am J Hypertens.* 2007; 20: 403-9.
46. Chess DJ, Lei B, Hoit BD, Azimzadeh AM, Stanley WC. Deleterious effects of sugar and protective effects of starch on cardiac remodeling, contractile dysfunction, and mortality in response to pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293: H1853-60.