



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Loreta Casquel De Tomasi

**Influência da dieta hiperlipídica insaturada na
regulação do metabolismo energético lipídico
e na disfunção cardíaca de ratos com
estenose aórtica supravalvar**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Cicogna

**Botucatu
2017**

Loreta Casquel De Tomasi

Influência da dieta hiperlipídica insaturada na
regulação do metabolismo energético lipídico
e na disfunção cardíaca de ratos com
estenose aórtica supravalvar

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutora em Fisiopatologia
em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Cicogna

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Tomasi, Loreta Casquel De.

Influência da dieta hiperlipídica insaturada na
regulação do metabolismo energético lipídico e na
disfunção cardíaca de ratos com estenose aórtica
supraavalar / Loreta Casquel De Tomasi. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Antonio Carlos Cicogna
Capes: 40101002

1. Dieta hiperlipídica. 2. Estenose de válvula aórtica.
3. Metabolismo energético. 4. Metabolismo dos lipídeos.
5. Expressão gênica. 6. Ácidos graxos.

Palavras-chave: Dieta hiperlipídica; Disfunção cardíaca;
Estenose aórtica; Metabolismo lipídico miocárdico; Ratos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna, pela dedicação e atenção dispensada durante todos estes anos; jamais esquecerei seus ensinamentos.

À Paula Grippa Sant'Ana, pela amizade e ajuda inestimável na execução deste trabalho.

Ao Prof. Rui Curi e Gilson Murata, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP, pelo auxílio nos ensaios enzimáticos.

Aos amigos do laboratório LabCic pela amizade e convivência trocando experiências de trabalho e de vida.

Ao meu marido e meus familiares pelo incentivo e compreensão durante este período.

À FAPESP, pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho (processo 2012/19679-0).

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, minha gratidão!

Importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Introdução: Embora existam contradições, de uma maneira geral, os dados da literatura mostram que em modelos experimentais de hipertrofia cardíaca por sobrecarga pressórica com disfunção ventricular e fração de ejeção preservada, o metabolismo de carboidratos e ácidos graxos está normal. Na fase em que há redução da capacidade de ejeção, com ou sem insuficiência cardíaca, ocorre um desvio para a programação fetal, aumento na utilização de glicose e diminuição na oxidação de ácidos graxos, por redução da expressão e atividade de proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios. Não foram encontrados trabalhos que avaliaram o efeito de dieta hiperlipídica no metabolismo energético e função cardíaca após o estabelecimento da hipertrofia ventricular com disfunção diastólica isolada. **Objetivo:** Testar a hipótese de que o aumento na oferta de ácidos graxos insaturados, proveniente de dieta hiperlipídica, atenua a queda no metabolismo lipídico e a piora do desempenho cardíaco em ratos com hipertrofia ventricular e disfunção diastólica por sobrecarga pressórica. O mecanismo responsável seria o estímulo do PPAR α pelos ácidos graxos, atenuando a queda na expressão de genes e proteínas envolvidas na regulação do metabolismo energético lipídico. **Métodos:** Ratos *Wistar* machos (80g) foram separados em dois grupos: controle operado (Sham) e estenose aórtica supraavalvar (EAo). Após 6 semanas do procedimento cirúrgico, os animais Sham e EAo foram redistribuídos em novos grupos: tratados com dieta normolipídica insaturada (Sham-N, n=13 e EAo-N, n=11) ou com dieta hiperlipídica insaturada (Sham-H, n=12 e EAo-H, n=14) por 12 semanas, até a 18ª semana. A remodelação cardíaca foi caracterizada pelas análises estrutural e funcional por ecocardiograma na 6ª e 18ª semana e estudo macroscópico *post mortem*. O metabolismo energético lipídico cardíaco foi analisado pela expressão gênica e proteica do PPAR α , PGC1 α , FAT/CD36, CPT1 β , MCAD, pela atividade da beta-hidroxiacilCoA desidrogenase (OHADH) e pelo conteúdo de triacilglicerol (TAG). Foi analisada a atividade da hexoquinase (HK) e da fosfofrutoquinase (PFK), envolvidas na via glicolítica, e da citrato sintase (CS), referente ao ciclo de Krebs. A expressão proteica da lactato desidrogenase (LDH), da piruvato desidrogenase (PDH) e dos sensores metabólicos, AMPK total, AMPK fosforilada na treonina 172 e SIRT1 foram também analisadas, bem como as relações intracelulares AMP/ATP e NAD⁺/NADH. **Resultados:** Na 6ª semana, ao iniciar o tratamento dietético, os

animais EAo apresentavam hipertrofia ventricular esquerda concêntrica, disfunção diastólica e melhoria da função sistólica. Na 18ª semana os grupos EAo mantiveram a disfunção diastólica e melhoria do desempenho sistólico, ou seja, não houve piora da performance cardíaca durante o período experimental de 12 semanas. Não houve diferença na estrutura e função cardíaca entre os grupos EAo-N e EAo-H. Houve diminuição da expressão dos genes relacionados à captura e oxidação de lipídios (CD36, CPT1 β , MCAD) nos grupos EAo em comparação com os Sham, e não houve diferença entre os grupos EAo. A atividade da hexoquinase e fosfofrutoquinase foi maior nos EAo comparado com os Sham, e foi semelhante entre EAo-N e EAo-H. A atividade da OHADH não foi diferente entre EAo-N e Sham-N e também não diferiu entre EAo-N e EAo-H. O conteúdo de TAG miocárdico foi menor no grupo EAo-N vs Sham-N e não foi diferente entre os grupos EAo. A expressão das proteínas PGC1 α , PPAR α , CPT1 β , MCAD, LDH, PDH, dos sensores SIRT1, AMPK, pAMPK Thr172, e a relação NAD⁺/NADH não foram diferentes entre os quatro grupos. **Conclusão:** Em contraste com a nossa hipótese, durante a evolução da remodelação cardíaca, os animais com estenose aórtica apresentaram alteração parcial no metabolismo lipídico miocárdico e não tiveram piora da função cardíaca. A dieta hiperlipídica insaturada não teve efeito no processo metabólico e na função cardíaca desses animais. Os mecanismos no qual a dieta hiperlipídica não foi capaz estimular o PPAR α nos animais com estenose aórtica são desconhecidos.

Palavras-chave: estenose aórtica, disfunção cardíaca, dieta hiperlipídica, metabolismo lipídico miocárdico, ratos

ABSTRACT

Introduction: Although controversial, in general, data from literature show that in experimental models with ventricular dysfunction and preserved ejection fraction, the carbohydrates and fatty acids metabolism is normal. At the stage of reduced ejection capacity, with or without heart failure, there is a switch for fetal programming, increased glucose utilization, and decrease in fatty acid oxidation due to downregulation of proteins involved in lipids uptake and oxidation. There are no studies that evaluated the effects of high-fat diet on energy metabolism and cardiac function after the establishment of ventricular hypertrophy with isolated diastolic dysfunction. **Objective:** To test the hypothesis that increased unsaturated fatty acid supply, from a high-fat diet, attenuate the downregulation of lipid metabolism and the impairment of cardiac function in rats with left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction by stimulating genes and proteins involved in the regulation of lipid energy metabolism. **Methods:** Male *Wistar* rats (80g) underwent aortic stenosis (AS) or Sham surgery. After 6 weeks, rats received either normolipid diet (N, 17% calories from fat) or high-fat diet (H, 40% calories from fat) for 12 weeks yielding 4 groups: Sham-N (n=13), AS-N (n=11), Sham-H (n=12), AS-H (n=14). Cardiac structure and function was assessed by echocardiography at 6 and 18 weeks after surgery. Cardiac lipid energy metabolism was analyzed by gene and protein expression of PPAR α , PGC1 α , FAT/CD36, CPT1 β , MCAD, the activity of beta-hydroxy-acyl CoA dehydrogenase (OHADH) and TAG content. We analysed the activities of hexokinase (HK) and phosphofructokinase (PFK), involved in the glycolytic pathway, and citrate synthase (CS), from Krebs cycle. The protein expression of lactate dehydrogenase (LDH), pyruvate dehydrogenase (PDH) and the metabolic sensors, total AMPK, AMPK phosphorylated on threonine 172 and SIRT1 were also evaluated, as well as the intracellular AMP/ATP and NAD⁺/NADH ratios. **Results:** In the 6th week, prior to dietary treatment, the AS animals had left ventricular hypertrophy, diastolic dysfunction and improved systolic function. In the 18th week, AS animals kept diastolic dysfunction and improved systolic function, that is, there was no worsening of cardiac performance. There was no difference in cardiac structure and function between the AS-N and AS-H groups. There was a decrease in the expression of genes related to lipid uptake and oxidation (CD36, CPT1 β , MCAD) in the AS groups compared to the Sham, and there was no difference between the

AS groups. The activity of hexokinase and phosphofructokinase was higher in AS compared to Sham, and was similar between AS-N and AS-H. The activity of OHADH was not different between AS-N and Sham-N and also did not differ between AS-N and AS-H. TAG content was reduced in AS-N vs Sham-N and was not different between AS groups. Expression of the proteins PGC1 α , PPAR α , CPT1 β , MCAD, LDH, PDH, the sensors SIRT1, AMPK, pAMPK Thr172, and the NAD⁺/NADH ratio were not different among the four groups. **Conclusion:** In contrast to our hypothesis, during the progression of cardiac remodeling, animals with aortic stenosis showed partial alterations in myocardial lipid metabolism and did not present worsening of cardiac function. The high-unsaturated fat diet had no effect on the metabolic process and cardiac function of these animals. The mechanisms in which the high-fat diet was unable to stimulate PPAR α in animals with aortic stenosis is unknown.

Keywords: aortic stenosis, cardiac dysfunction, high-fat diet, myocardial lipid metabolism, rats

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição de macro e micronutrientes das rações.....	22
Tabela 2. Composição de ácidos graxos (% do total).....	22
Tabela 3. Perfil nutricional dos animais.....	38
Tabela 4. Porcentagem (%) de umidade nos tecidos.....	39
Tabela 5. Dados ecocardiográficos dos grupos Sham e EAo na 6ª semana.....	40
Tabela 6. Dados ecocardiográficos dos grupos EAo-N e EAo-H na 6ª semana...	41
Tabela 7. Dados ecocardiográficos dos grupos na 18ª semana.....	42
Tabela 8. Análise macroscópica cardíaca <i>post mortem</i>	44
Tabela 9. Determinação dos nucleotídeos de adenina fosfato por HPLC.....	48

Lista de figuras

Figura 1. Representação esquemática da regulação do metabolismo lipídico.....	16
Figura 2. Delineamento experimental.....	21
Figura 3. Expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico.....	45
Figura 4. Atividade de enzimas metabólicas.....	46
Figura 5. Expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico.....	47
Figura 6. Expressão proteica de sensores metabólicos.....	47
Figura 7. Expressão proteica de enzimas relacionadas ao metabolismo.....	48
Figura 8. Relação de NAD^+/NADH cardíaco.....	49
Figura 9. Conteúdo de TAG cardíaco.....	50

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

Lista de tabelas

Lista de figuras

1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1- Animais.....	20
2.2- Protocolo experimental.....	20
2.3- Composição das rações normolipídica e hiperlipídica.....	21
2.4- Indução de estenose aórtica supravalvar.....	23
2.5- Análise do perfil nutricional.....	23
2.6- Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático..	25
2.7- Caracterização da remodelação cardíaca.....	25
2.7.1- Análise estrutural e funcional do coração por ecocardiograma.....	25
2.7.2- Análise macroscópica do coração <i>post mortem</i>	26
2.7.3- Análise do metabolismo energético e sensores metabólicos.....	27
2.7.3.1- Expressão gênica pela técnica de PCR em Tempo Real.....	27
2.7.3.2- Atividade das enzimas reguladoras das vias metabólicas.....	30
2.7.3.3- Expressão proteica pela técnica de Western Blot.....	31
2.7.3.4- Análise das relações intracelulares AMP/ATP e NAD ⁺ /NADH.....	34
2.7.3.5- Determinação do conteúdo de triacilglicerol cardíaco.....	34
2.8- Análise estatística.....	35
3. RESULTADOS	36
3.1- Perfil nutricional.....	37
3.2- Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático.....	39
3.3- Caracterização da remodelação cardíaca.....	40
3.3.1- Ecocardiograma dos grupos Sham e EAo na 6 ^a semana.....	40
3.3.2- Estrutura e função do coração por ecocardiograma na 18 ^a semana.....	41
3.3.3- Análise macroscópica do coração <i>post mortem</i>	43
3.3.4- Expressão gênica pela técnica de PCR em Tempo Real.....	45

3.3.5- Atividade das enzimas de vias metabólicas.....	45
3.3.6- Expressão proteica pela técnica de Western Blot.....	46
3.3.7- Relações intracelulares AMP/ATP e NAD ⁺ /NADH.....	48
3.3.8- Conteúdo de triacilglicerol cardíaco.....	50
4. DISCUSSÃO	51
4.1- Dieta hiperlipídica.....	52
4.2- Perfil nutricional na 18 ^a semana.....	52
4.3- Estrutura e função por ecocardiograma na 6 ^a semana.....	53
4.4- Estrutura e função por ecocardiograma na 18 ^a semana.....	53
4.5- Metabolismo energético miocárdico.....	55
5. CONCLUSÃO	59
6. REFERÊNCIAS	61

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A remodelação cardíaca (RC) pode ser definida como alterações na expressão gênica, moleculares, celulares ou intersticiais que podem manifestar-se clinicamente por alterações de tamanho, forma e função do coração em resposta a determinadas agressões como, por exemplo, isquemia, inflamação, alterações genéticas, e sobrecarga volumétrica ou pressórica⁽¹⁻³⁾. O processo de RC é tempo dependente; a longo prazo pode ser prejudicial, constituindo importante fator de risco para o desenvolvimento da disfunção ventricular e insuficiência cardíaca(IC)⁽⁴⁻⁶⁾.

Existem diversos modelos experimentais para o estudo da RC por sobrecarga pressórica⁽⁷⁻¹⁶⁾. O modelo de estenose aórtica supravalvar (EAo) tem sido utilizado para promover o desenvolvimento gradual de hipertrofia ventricular esquerda em ratos jovens^(3,6,10-16); inicialmente a sobrecarga pressórica é leve, acentuando-se progressivamente à medida que os animais crescem. Em nosso laboratório, por estudo ecocardiográfico, constatou-se que após 2 e 6 semanas da indução da EAo, os ratos desenvolvem hipertrofia ventricular esquerda⁽¹³⁾, disfunção diastólica e melhoria da função sistólica⁽³⁾. Esses estudos mostraram manutenção da disfunção diastólica e deterioração do desempenho sistólico a partir da 12^a semana; após a 18^a semana há acentuação da deterioração sistólica e aparecimento de sinais de insuficiência cardíaca^(5,11,12).

Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela depressão da função cardíaca não estão totalmente esclarecidos. Diversos fatores podem contribuir para a disfunção no modelo experimental de EAo como, por exemplo, alteração no metabolismo energético⁽¹⁷⁻²²⁾.

No coração adulto cerca de 60-70% da energia utilizada no processo de

contração e relaxamento é normalmente obtida a partir da beta oxidação de ácidos graxos, sendo a contribuição da via glicolítica em torno de 30-40%⁽²³⁻²⁸⁾. O miocárdio não sintetiza ácidos graxos, a utilização deste substrato depende fundamentalmente de suprimentos exógenos. As fontes para o coração incluem os ácidos graxos livres plasmáticos provenientes da dieta e da hidrólise dos depósitos de triacilglicerol pela ação da lipase hormônio sensível^(23,24,29,30). Estudos clínicos e experimentais têm mostrado que o fator responsável pela escolha da fonte energética cardíaca são os níveis plasmáticos elevados do nutriente^(23,24,31-36). Quando as concentrações no plasma de ácidos graxos são baixas e as de glicose e de insulina são altas, como no estado pós-prandial, a glicose se torna o principal substrato para o metabolismo oxidativo do coração^(23,24,30). Entretanto, quando há aumento dos níveis de ácidos graxos, há inibição da glicólise no citosol e da ação da enzima piruvato desidrogenase na mitocôndria^(32,37).

Evidências recentes sugerem que a regulação do metabolismo cardíaco de lipídios ocorre, principalmente, pela ação dos fatores transcricionais, o receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR α) e seu coativador denominado PPAR gamma coativador-1alfa (PGC1 α)⁽³⁸⁻⁴²⁾. O PGC1 α se liga ao PPAR α aumentando sua atividade e induzindo a transcrição de diversos genes envolvidos no metabolismo dos ácidos graxos como, por exemplo, a translocase de ácidos graxos (FAT/CD36), a carnitina palmitoiltransferase 1 beta (CPT1 β) e a acil coenzima A desidrogenase de cadeia média (MCAD)^(23,24,38-40). A ativação do PPAR α no coração também ocorre em resposta aos ácidos graxos de cadeia longa, seu principal ligante endógeno, criando um mecanismo de regulação baseado no fornecimento de substrato⁽³⁸⁾. O PGC1 α tem função relevante nas adaptações metabólicas de acordo com o estado energético da célula, e sua atividade está

relacionada a sensores celulares capazes de sentir perturbações metabólicas e disponibilidade de substrato⁽³⁸⁻⁴²⁾. Estes sensores funcionam como sinalizadores do estado metabólico celular, determinando quais respostas serão executadas para adaptar-se às novas condições. Dois sensores, a sirtuina 1 (SIRT1) e a proteína quinase dependente de adenosina monofosfato (AMPK), desempenham papéis importantes na regulação metabólica celular e, recentemente, foi descoberto que ambos interagem com PGC1 α para regular a transcrição de genes metabólicos na tentativa de manter os níveis energéticos normais^(41,42). A atividade da AMPK e da SIRT1 refletem as alterações intracelulares que ocorrem na razão AMP/ATP e NAD⁺/NADH, respectivamente. No núcleo, a AMPK interage com PGC1 α por fosforilação direta e, no citoplasma estimula a entrada de ácidos graxos na mitocôndria por desinibição da CPT1 β . A ativação da AMPK tem sido relacionada com a regulação do metabolismo de ácidos graxos e glicose, aumentando a produção de energia. A SIRT1 interagindo com a PGC1 α no núcleo e no citoplasma promove a desacetilação desta proteína e sua consequente ativação⁽⁴²⁻⁴⁶⁾ (Figura 1).

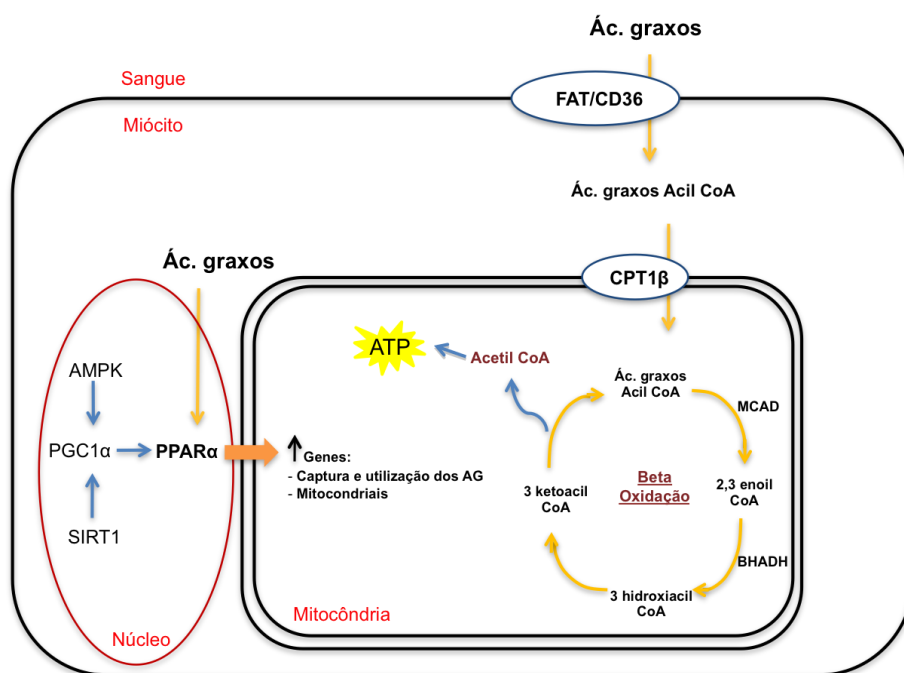


Figura 1. Representação esquemática da regulação do metabolismo lipídico.

Embora existam contradições, de uma maneira geral, os dados da literatura mostram que o metabolismo de ácidos graxos está normal e a glicólise está aumentada em modelos experimentais de cardiopatias por sobrecarga pressórica com disfunção ventricular diastólica e fração de ejeção preservada^(21,22). Na fase em que há redução da capacidade de ejeção, com ou sem insuficiência cardíaca, ocorre um desvio para a programação fetal com diminuição na oxidação de ácidos graxos, este último consequente à redução da expressão e atividade de proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios⁽¹⁷⁻²⁸⁾. A expressão do PPAR α e seu coativador PGC1 α estão diminuídas, sugerindo o decréscimo das proteínas envolvidas no metabolismo dos ácidos graxos como, por exemplo, a FAT/CD36, a CPT1 β e a MCAD^(38,39,47-51). A diminuição na beta oxidação com consequente redução da disponibilidade energética, acarreta ativação dos sensores energéticos como a AMPK e a SIRT1. Neste estágio, a atividade da AMPK está aumentada refletindo o estresse energético da célula, que apresenta elevação na razão AMP/ATP^(52,53). Alcendor et al. estudaram o comportamento da SIRT1 em modelo experimental de insuficiência cardíaca em cães; estes autores mostraram que a expressão desta proteína está aumentada somente quando os animais apresentam sinais clínicos de insuficiência cardíaca⁽⁵⁴⁾. Este mesmo grupo mostrou que a expressão da SIRT1 está aumentada em corações de camundongos após 2 e 4 semanas de sobrecarga pressórica⁽⁵⁵⁾.

Uma dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados reduz triglicérides plasmáticos, arritmias cardíacas, morte súbita, risco de doença cardíaca isquêmica e insuficiência cardíaca, sendo portanto recomendada para melhoria da saúde cardiovascular^(56,57). Em adição, a administração da dieta rica em ácidos graxos insaturados poderia fornecer o ligante para ativar o PPAR α , aumentando a

expressão de proteínas envolvidas no metabolismo dos ácidos graxos, permitindo maior captura e oxidação dos lipídeos. Esta alteração na expressão proteica poderia atenuar ou retardar a disfunção metabólica e a mecânica que ocorrem durante a progressão da remodelação cardíaca patológica.

Limitado número de estudos avaliaram a relação entre metabolismo energético miocárdico e dieta hiperlipídica em modelos experimentais de remodelação cardíaca por sobrecarga pressórica⁽⁵⁷⁻⁶²⁾; os trabalhos que avaliaram esta relação apresentaram resultados divergentes, não alterando⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾ ou melhorando⁽⁶⁰⁻⁶²⁾ as variáveis envolvidas no metabolismo energético lipídico. Com relação ao efeito do aumento na oferta de ácidos graxos na progressão da remodelação estrutural e/ou funcional cardíaca por sobrecarga pressórica⁽⁵⁶⁻⁶²⁾, os achados são contraditórios, desde que os autores não encontraram alteração⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾ ou verificaram atenuação da remodelação^(57,58,62,63). É importante ressaltar que todos estes autores iniciaram a dieta logo após a cirurgia. A diversidade dos dados pode ser consequência de diferentes modelos experimentais, composição das dietas, momentos de tratamento e variáveis analisadas.

Não foram encontrados trabalhos que avaliaram o efeito do tratamento dietético hiperlipídico sobre o metabolismo energético e sobre a função cardíaca após o estabelecimento da hipertrofia ventricular acompanhada de disfunção diastólica. O objetivo deste trabalho é testar a hipótese de que o aumento na oferta de ácidos graxos insaturados, proveniente de dieta hiperlipídica, atenua a queda no metabolismo lipídico e a piora do desempenho cardíaco em ratos com hipertrofia ventricular e disfunção diastólica por sobrecarga pressórica. O mecanismo responsável seria o estímulo do PPAR α pelos ácidos graxos, atenuando a queda na expressão de genes e proteínas envolvidas no metabolismo energético lipídico.

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Animais

No presente estudo foram utilizados ratos *Wistar* machos, com 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, São Paulo, Brasil. Os animais foram mantidos nas seguintes condições: gaiolas individuais de polipropileno com tampas de arame cromado forradas com maravalha de *Pinus* esterilizada; temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade controlada ($55 \pm 5\%$) e ciclos de iluminação de 12 horas. A oferta de água e ração foi *ad libitum*, e a ingestão alimentar e o peso corporal foram aferidos semanalmente. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the U.S. National Institutes of Health” e aprovados pela “Comissão de Ética Experimental em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP”.

2.2 – Protocolo Experimental

Foram formados dois grupos experimentais: controle operado (Sham) e estenose aórtica supravalvar (EAo). Após 6 semanas do procedimento cirúrgico, os animais do grupo Sham e os do grupo EAo foram distribuídos em dois novos grupos: tratados com dieta normolipídica insaturada (Sham-N, n=13 e EAo-N, n=11) ou com dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos insaturados (Sham-H, n=12 e EAo-H, n=14) (Figura 1). As dietas hiperlipídicas foram administradas após 6 semanas de EAo em razão de trabalhos anteriores mostrarem que esses animais apresentam hipertrofia ventricular esquerda, disfunção diastólica e melhoria da função sistólica do ventrículo esquerdo^(3,5,13).

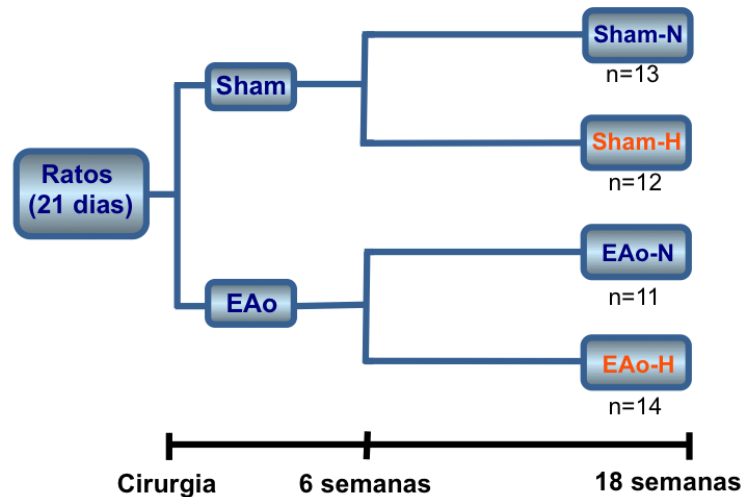


Figura 2. Delineamento experimental

Os animais de todos os grupos foram avaliados 12 semanas após o início da administração das dietas normo e hiperlipídica, ou seja, 18 semanas após o procedimento cirúrgico. Neste período os animais apresentam piora da função diastólica e deterioração do desempenho sistólico, não acompanhado de sinais de insuficiência cardíaca que ocorre, geralmente, a partir da 18ª semana^(6,16). Os animais que apresentaram sinais de insuficiência cardíaca como taquipnéia associada a um dos seguintes sinais: edema, ascite, congestão pulmonar, derrame pleuro-pericárdico, trombo em átrio esquerdo e hipertrofia do ventrículo direito, foram excluídos do protocolo experimental.

2.3 – Composição das rações normolipídica e hiperlipídica

As rações nomolipídica e hiperlipídica, idealizadas no Laboratório Experimental de Músculo Papilar Isolado da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX), Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, foram adaptadas a partir de modelo dietético utilizado anteriormente pelo grupo⁽⁶⁴⁾ e manipuladas com a parceria da empresa Biotron Zootecnica® (Rio Claro, São Paulo, Brasil).

Foram utilizados os seguintes ingredientes: farelo e casca de soja, milho, dextrina, óleos de soja e palmístico e premix vitamínico e mineral. A composição de nutrientes e a distribuição dos macronutrientes em relação ao valor calórico total das dietas estão apresentadas na Tabela 1. O perfil dos ácidos graxos está descrito na Tabela 2; os ácidos graxos insaturados do tipo oleico e linoléico são os mais abundantes.

Tabela 1. Composição de macro e micronutrientes das rações

Componentes	Rações	
	Normolipídica	Hiperlipídica
Proteína (%)	24 (31)	18 (19)
Carboidrato (%)	40 (52)	40 (41)
Gordura (%)	6 (17)	17 (40)
Fibras (%)	12	9
Outros* (%)	18	16
Calorias (Kcal/g)	3,10	3,85

* Outros: umidade, vitaminas e minerais. Dados entre (): valores calóricos.

Tabela 2. Composição de ácidos graxos (% do total)

Ácidos graxos	Rações	
	Normolipídica	Hiperlipídica
C6, Capríco	0,04	0,04
C8, Caprílico	0,61	0,63
C10, Cáprico	0,66	0,69
C12, Láurico	9,47	9,73
C14, Mirístico	3,47	3,54
C16, Palmítico	12,19	11,44
C18, Esteárico	3,42	3,47
C20, Araquídico	0,37	0,36
C22, Beénico	0,34	0,37
C24, Lignocérico	0,13	0,13

C16:1, Palmitoleico	0,08	0,07
C18:1n9c, Oleico	26,09	27,51
C18:1n7, cis-Vacênico	1,19	1,14
C18:2n6c, Linoleico	38,07	37,04
C18:3n3, α -Linolênico	3,69	3,65
C20:1n9, Eicosanóico	0,18	0,19
Total saturados	30,7	30,4
Total insaturados	69,3	69,6

2.4 – Indução de estenose aórtica supraavalvar

A EAO foi induzida de acordo com o método previamente descrito em nosso laboratório^(3,5,10-13). Os animais com três a quatro semanas de vida e pesando de 70 a 90 g, após anestesia com cloridrato de ketamina (60 mg/kg) e cloridrato de xilidino (10 mg/kg) intraperitoneal, foram submetidos à toracotomia mediana, a aorta ascendente foi dissecada e um clipe de prata, com 0,6 mm de diâmetro interno, colocado aproximadamente a 3 mm da sua raiz. A parede torácica foi fechada, sendo o esterno, as camadas musculares e a pele suturados com fio *mononylon* 5.0. Durante a cirurgia, os animais receberam intraperitonealmente 1 ml de soro fisiológico aquecido e foram ventilados manualmente com pressão positiva, oxigênio a 100%. Concluído o ato cirúrgico, os ratos foram colocados em superfície aquecida até retornarem da anestesia. Os animais do grupo Sham foram submetidos à mesma cirurgia, mas sem a colocação do clipe.

2.5 – Análise do perfil nutricional e bioquímico

O perfil nutricional e bioquímico foi determinado pela análise de ingestão calórica, eficiência alimentar, peso e gordura corporal, índice de adiposidade, glicemia, triacilglicerol e ácidos graxos livres não-esterificados (NEFA). A ingestão

calórica foi calculada pela seguinte fórmula: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor energético de cada dieta (g x kcal). A eficiência alimentar, que analisa a capacidade do animal de converter a energia alimentar consumida em peso corporal, foi calculada dividindo-se o ganho total de peso dos animais (g) pela energia total ingerida (Kcal). Como os animais alimentados com dieta hiperlipídica podem desenvolver aumento na taxa de gordura corporal, o índice de adiposidade foi avaliado nos grupos experimentais. Após a eutanásia, foram coletados os depósitos de gordura epididimal, visceral e retroperitoneal dos animais. A partir da soma dos depósitos normalizada pelo peso corporal $[(\text{epididimal} + \text{retroperitoneal} + \text{visceral}) / \text{peso corporal} \times 100]$ calculou-se o índice de adiposidade, adaptado de Boustany et al 2005⁽⁶⁵⁾. Para análise do perfil lipídico os ratos foram colocados em jejum por 12 a 15 horas, anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg/ip) e eutanasiados por decapitação. A seguir, as amostras de sangue foram coletadas em tubos Falcon, centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e armazenadas em freezer à -80°C. A concentração plasmática de triacilglicerol foi analisada com kit específico (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil) pelo método enzimático colorimétrico automatizado (Chemistry Analyzer BS-200, Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China). Os níveis de NEFA plasmáticos foram avaliados com kit (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) pelo método enzimático colorimétrico e leitura em leitor de microplaca (Spectra MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Para a análise da glicemia basal os animais foram expostos a jejum e anestesia, vide acima, e as coletas de sangue foram realizadas na artéria caudal; os níveis glicêmicos foram avaliados com glicosímetro portátil Accu-Chek Go Kit (Roche Diagnostics Brazil Ltda, São Paulo, Brasil).

2.6 – Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

A avaliação do teor de água tecidual foi realizada nas amostras de ventrículos esquerdo e direito, átrio, pulmão e fígado. Após a remoção do tecido a ser examinado, foi aferido o peso *in natura*. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem em estufa sob temperatura de $55 \pm 5^\circ\text{C}$, por um período de 48 horas. A determinação do teor de água foi expressa em valores relativos e calculada pela seguinte fórmula: $[(\text{PN}-\text{PS})/\text{PN}] \times 100\%$, onde PN representa o peso *in natura* e o PS o peso seco.

2.7 – Caracterização da remodelação cardíaca

2.7.1 – Análise estrutural e funcional do coração por ecocardiograma

A análise estrutural e funcional cardíaca foi realizada *in vivo* por meio do ecocardiograma. A análise ecocardiográfica foi realizada após 6 e 18 semanas da indução de EAo. O estudo após 6 semanas teve como finalidade caracterizar, estrutural e funcionalmente, os ratos, a fim de formar dois grupos homogêneos com EAo: EAo-N e EAo-H.

Para a realização do exame, os ratos foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip) e posicionados em decúbito lateral esquerdo. Utilizou-se o ecocardiógrafo modelo Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Tirat Carmel, Israel), equipado com transdutor eletrônico de 12 MHz. Para medir as estruturas cardíacas, foram utilizadas imagens em modo-M com o feixe de ultra-som orientado pela imagem bidimensional com o transdutor na posição paraesternal eixo menor. A imagem monodimensional do ventrículo esquerdo (VE) foi obtida posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares⁽¹⁶⁾. As imagens da aorta e do átrio esquerdo

também foram obtidas na posição paraesternal eixo menor com o cursor do modo-M posicionado ao nível da valva aórtica. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico do VE (DDVE) e a espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do VE (DSVE) e a espessura sistólica da parede posterior do VE (ESPP) e septo interventricular (ESSIV) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro mínimo da cavidade. Para avaliar a função sistólica do VE, foram calculadas a porcentagem de encurtamento mesocárdico (% Enc. Meso), $\{[(DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV) - (DSVE + \frac{1}{2} ESPP + \frac{1}{2} ESSIV)] / (DDVE + \frac{1}{2} EDPP + EDSIV)\}$ e a velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (VEPP), tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior. No estudo da função diastólica do VE foram medidos os picos das velocidades do fluxo transvalvar mitral correspondentes à fase de enchimento inicial (onda E) e à fase de enchimento tardio, conseqüente à contração atrial (onda A), bem como o cálculo da relação onda E / onda A. Para a obtenção dos fluxos relacionados à função diastólica, o transdutor foi posicionado na região correspondente à ponta do coração na imagem denominada quatro câmaras; a medida dos fluxos foi realizada no monitor do ecocardiógrafo.

2.7.2 – Análise macroscópica do coração *post mortem*

A análise macroscópica *post mortem* permite identificar a presença de hipertrofia atrial e ventricular e foi realizada somente 18 semanas após a indução da EAo. Os animais foram submetidos à anestesia com pentobarbital sódico (50

mg/kg/ip) e eutanasiados por decapitação. O coração dos animais foi removido e dissecado. Para indicar o grau de hipertrofia cardíaca foram avaliados o peso dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) e o peso dos átrios (AT). Também foram analisadas as relações VE, VD e AT pelo comprimento da tíbia e pelo peso corporal final (PCF) obtendo as seguintes relações: VE/tíbia, VD/tíbia, AT/tíbia, VE/PCF, VD/PCF e AT/PCF.

2.7.3 – Análise do metabolismo energético miocárdico e sensores metabólicos celulares

O metabolismo energético lipídico cardíaco foi analisado pela expressão gênica e proteica do PPAR α , PGC1 α , FAT/CD36, CPT1 β , MCAD e pela atividade da beta-hidroxi-acil CoA desidrogenase (OHADH). Foi analisada a atividade da hexoquinase (HK) e da fosfofrutoquinase (PFK), envolvidas na via glicolítica, e da citrato sintase (CS), referente ao ciclo de Krebs. Foram analisadas as expressões proteicas das enzimas lactato desidrogenase (LDH) e piruvato desidrogenase (PDH).

A análise dos sensores metabólicos foi realizada pela expressão proteica da AMPK total, da AMPK fosforilada na treonina 172 representando sua forma ativa e da SIRT1. Também foram avaliadas as relações intracelulares AMP/ATP e NAD⁺/NADH.

2.7.3.1 - Expressão gênica pela técnica de PCR em Tempo Real

Extração do RNA total

Fragmentos de VE foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho

Polytron (Ika Ultra Turrax® T25 Basic, Wilmington, NC, USA) com 1 ml de TRIzol® (Invitrogen Brasil, São Paulo) para cada 100 mg de tecido. A seguir foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio por ml de TRIzol seguido de centrifugação para permitir a separação das fases e retirada do sobrenadante o qual contém o RNA. Foi adicionado ao sobrenadante 0,5 ml de álcool isopropílico e centrifugado para formação do pellet de RNA. Após a remoção do sobrenadante o pellet foi lavado com 1 ml de etanol 75% e novamente centrifugado. Ao final do procedimento, retirou-se o etanol para ressuspender o pellet em água ultrapura tratada com dietilpircarbonato (DEPC). As amostras foram incubadas durante 10 minutos a 55-60°C para posterior armazenamento a -80°C.

A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) na absorbância de 260 nm. A pureza do RNA foi constatada pela razão das absorbâncias em 260/280 nm. As amostras cujas razões foram inferiores a 1,6 foram descartadas por apresentarem contaminação por proteínas.

Obtenção do cDNA - Transcrição reversa (RT) do RNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Inicialmente, preparou-se uma mistura com 2 µl de Buffer, 0,8 µL de dNTP Mix 100 mM, 2 µL de Random Primers, 1 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1 µl de inibidor de Rnase e 3,2 µl de água livre de nuclease. Em seguida adicionou-se à mistura 10 µl da amostra de RNA na concentração de 1000ng/µl. Para verificar a qualidade da transcrição reversa foi realizado um controle negativo, ou seja, uma amostra de RNA foi submetida à reação, porém, a enzima MultiScribe™ Reverse Transcriptase foi

substituída por 1 μL de água livre de nuclease. A mistura total foi incubada em termociclador Mastercycler[®] Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) programado com as seguintes etapas:

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Tempo	10 min	120 min	5 min	∞

PCR em Tempo Real

O PCR em tempo real foi realizado com ensaios prontos (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) contendo sonda TaqMan MGB (FAM) e *primers* específicos. A identificação dos ensaios está apresentada no Quadro 1. O sistema TaqMan utiliza uma sonda fluorescente que permite a detecção de um produto específico da PCR conforme seu acúmulo durante os ciclos da reação. A sonda é constituída por um corante reporter fluorescente na extremidade 5' e um corante quencher (silenciador) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do quencher reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante reporter através da transferência de energia por ressonância de fluorescência. A sonda se anela a sequência antes dos *primers* e é clivada por meio da atividade da nuclease 5' da Taq DNA polimerase enquanto o *primer* é estendido. A clivagem da sonda separa o corante reporter do corante quencher, aumentando o sinal da fluorescência emitida pelo corante reporter. A fluorescência foi monitorada em tempo real com um aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As amostras foram normalizadas pelo controle interno β -actina e a quantificação da expressão realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, conforme manual do fabricante.

Quadro 1. Ensaios utilizados para PCR em Tempo Real

Gene	Código Ensaio
PPAR α	Rn00566193_m1
PGC1 α	Rn00580241_m1
FAT/CD36	Rn00580728_m1
CPT1 β	Rn00566242_m1
MCAD	Rn00566390_m1
β -actina	Rn00667869_m1

Cada reação foi realizada em triplicata. Diferenças na expressão foram determinadas pelo método Ct descrito no manual do usuário ABI (*Applied Biosystems*).

2.7.3.2 – Quantificação da atividade das enzimas reguladoras das vias metabólicas

Foram analisadas a atividade de enzimas chave que participam do metabolismo de glicose e de ácidos graxos: fosfofrutoquinase (PFK, E.C.2.7.1.11) e hexoquinase (HK, E.C.2.7.1.1), associada com a via anaeróbica; β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (OHADH, E.C.1.1.1.35), associada com a oxidação de ácidos graxos; e citrato sintase (CS, E.C. 4.1.3.7) associado com o ciclo de Krebs e via aeróbica. Amostras do ventrículo esquerdo foram homogeneizadas em 50 mmol/l de Tris-HCl, 1 mmol/L de EDTA, e coquetel de inibidor de protease, pH 7.4, utilizando um instrumento Polytron (Kinematica, Littau-Lucerna, Suíça). O lisado foi centrifugado a 12000 rpm durante 10 min a 4°C e o sobrenadante foi recolhido. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas a 25°C utilizando espectrofotômetro de microplacas Spectra Max 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A atividade da citrato sintase foi medida numa mistura de reação contendo 100 mmol/l de Tris-HCl, 1 mmol/l de MgCl₂, 1 mmol/l de EDTA, 0,2 mmol/l ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico), 0,3 mmol/l de acetil-CoA, e 0,5 mmol/l de oxaloacetato (omitido no controle), pH 8.2.

A taxa de alteração da absorvância foi monitorada a 412 nm ($\epsilon = 13.6 \mu\text{mol}.\text{ml}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Para β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (OHADH), a mistura de reação continha 100 mmol/l de PBS, 0,45 mmol/l de NADH, e 0,1 mmol/l de acetoacetil-CoA (omitido no controle), pH 7.3. A atividade da OHADH foi medida a 340 nm, seguindo o desaparecimento do NADH ($\epsilon = 6.22 \mu\text{mol}.\text{ml}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). A PFK foi medida em tampão (pH 8.2) contendo 50 mmol/l de Tris-HCl, 6,7 mmol/l de MgCl_2 , 200 mmol/l de KCl, 1 mmol/l, β -mercaptoetanol, 0,05% de Triton X-100, 1 mmol/l de ATP, 2 mmol/l de AMP, 0,2 mmol/l de NAD^+ , 0,9 unidades/ml de aldolase, 0,16 unidades/ml de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, 9,6 unidades/ml de triosefosfato-isomerase, antimicina A, e 3 mmol/l de frutose-6-fosfato, com medições a 340 nm da velocidade de oxidação do NADH. HK foi testada numa mistura de reação contendo 75 mmol/l de Tris-HCl, 7,5 mmol/l de MgCl_2 , 0,8 mmol/l de EDTA, 1,5 mmol/l de KCl, 4 mmol/l, β -mercaptoetanol, 0,05% de Triton X-100, 0,4 mmol/l de NADP^+ , 2,5 mmol/l de ATP, 1,4 unidades/ml de glicose-6-fosfato desidrogenase e 1,0 mmol/l de glicose, pH 7,2; reação foi monitorada a 340 nm.

2.7.3.3 – Expressão proteica pela técnica de Western Blot

Extração das proteínas miocárdicas

Fragmentos do ventrículo esquerdo foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C . A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho Polytron Ultra TurraxTM T25 Basic (IKA Works, Wilmington, NC, USA) com tampão de lise RIPA (Amresco, Solon, OH, USA) contendo inibidores de protease e fosfatase (Roche, Indianapolis, IN, USA). O processo foi realizado três vezes durante 10 segundos a 4°C , com intervalos de 20 segundos. O produto da homogeneização foi centrifugado a 12000 rpm por 20

minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para tubos *ependorfs* e armazenado em freezer -80°C. A concentração de proteína foi analisada utilizando o kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Western Blot

A expressão proteica foi realizada pela técnica de *Western Blot*, que é um método utilizado em pesquisas para detectar proteínas em um homogenato de tecido biológico. Neste trabalho foi analisada a expressão das seguintes proteínas: PGC1 α , PPAR α , FAT/CD36, CPT1 β , MCAD, AMPK, *phospho* AMPK Thr172, SIRT1, LDH e PDH utilizando a β -actina como normalizador.

Após a extração e quantificação da concentração proteica, as amostras cardíacas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris-HCL 240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris-HCL 240mM pH 6,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCL 240mM pH 8,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed). A concentração do gel de resolução foi entre 6 a 15%, dependendo do peso molecular da proteína analisada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) para identificação do tamanho das bandas. A corrida eletroforética foi efetuada a 120V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por um período variável de acordo com o tamanho da proteína, em média 1h30 minutos, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

Após corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando-se sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

contendo tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Após a transferência os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados com solução a 5% de leite em pó desnatado Molico® (Nestlé Brasil, Araçatuba, SP, Brasil) dissolvido em tampão TBS-T (Tris 10mM, pH 7,6, NaCl 150 mM e Tween 20 0,1%), incubado por 120 minutos à temperatura ambiente (24°C) sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-T (Tris 10mM, pH 7,6, NaCl 150 mM e Tween 20 0,1%) e incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora, sob agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-T e incubada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído na solução bloqueadora, por 90 minutos sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-T. A imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA). Finalmente, as membranas de nitrocelulose foram analisadas em fotodocumentador ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, Chalfont, UK) e as análises quantitativas das bandas protéicas (*blots*) foram realizadas pelo software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

Anticorpos primários

- *PPAR α* , rabbit IgG (ab8934 - Abcam, Cambridge, MA, USA).
- *PGC1 α* , rabbit IgG (sc-13067 - Santa Cruz, Dallas, TX, USA).
- *FAT/CD36*, rabbit IgG (ab133625 - Abcam, Cambridge, MA, USA).
- *CPT1 β* , rabbit IgG (NBP1-59576 - Novus Biologicals, Littleton, CO, USA).
- *MCAD*, mouse IgG1 (ab110296 - Abcam, Cambridge, MA, USA).

- *AMPK, rabbit IgG* (2793 - Cell Signaling, Danvers, MA, USA).
- *Phospho-AMPK(Thr172), rabbit IgG* (2535-Cell Signaling, Danvers, MA, USA).
- *SIRT1, mouse IgG1* (8469 - Cell Signaling, Danvers, MA, USA).
- *LDH, rabbit IgG* (2012 - Cell Signaling, Danvers, MA, USA).
- *PDH, rabbit IgG* (2784 - Cell Signaling, Danvers, MA, USA).

Anticorpo de normalização

- *β -Actin, rabbit IgG* (4967 - Cell Signaling, Danvers, MA, USA).

Anticorpos secundários

- *Anti-Rabbit IgG-HRP* (Abcam, Cambridge, MA, USA).
- *Anti-Mouse IgG-HRP* (Abcam, Cambridge, MA, USA).

2.7.3.4 – Análise das relações intracelulares AMP/ATP e NAD⁺/NADH

As concentrações intracelulares de AMP e ATP foram avaliadas pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) segundo metodologia descrita por Bak and Ingwall⁽⁶⁶⁾. Os níveis de NAD⁺ e NADH no miocárdio foram avaliadas utilizando o kit comercial EnzyChrom NAD⁺/NADH assay kit, de acordo com o protocolo do fabricante (Bioassay Systems, Hayward, CA, USA). As concentrações de NAD⁺ e NADH das amostras foram determinadas por medição colorimétrica a 565 nm e comparação com a curva padrão de NAD⁺.

2.7.3.5 – Determinação do conteúdo de triacilglicerol cardíaco

Os lipídios totais foram extraídos do coração utilizando o método de Folch modificado. Aproximadamente 25 mg de tecido foi homogeneizado em 500 μ l de PBS num homogeneizador de esferas usando esferas de aço inoxidável durante 5 min a 4°C. Em cada amostra, adicionou-se 2 ml de 2:1 clorofórmio:metanol e agitou-

se em vortex. As amostras foram então centrifugadas durante 30 min a 2100 rpm a 4°C. A fase orgânica inferior foi recolhida e seca sob nitrogênio gasoso. O lipídio seco foi em seguida dissolvido em 300 µl de 0,5% Triton X-100 em isopropanol, e depois quantificado utilizando kit disponível comercialmente (TG kit - Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan).

2.8 – Análise estatística

Os dados foram expressos por meio de medidas descritivas de posição e variabilidade. A comparação entre os grupos Sham e EAo na 6ª semana pós-indução da EAo foi realizada pelo teste "t" de Student. As comparações entre os grupos no final do experimento, 18ª semana, foram realizadas pela técnica de análise de variância (ANOVA) para esquema de dois fatores (quando não-paramétrico, Kruskal-Wallis) complementada com teste de comparações múltiplas de Bonferroni (quando não-paramétrico, Dunn). O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 – Perfil nutricional

Os parâmetros de avaliação do perfil nutricional dos animais ao final do experimento, na 18ª semana, estão apresentados na Tabela 3. Não houve diferença estatística no peso corporal final, no ganho de peso e na ingestão calórica entre os quatro grupos. A ingestão alimentar foi menor nos grupos Sham-H e EAo-H em relação aos grupos Sham-N e EAo-N, respectivamente. A eficiência alimentar foi maior nos grupos Sham-H e EAo-H vs Sham-N e EAo-N, respectivamente. A gordura corporal total e o índice de adiposidade foram menores no grupo EAo-N em relação ao grupo Sham-N e EAo-H.

Os níveis de triacilglicerol e glicemia não foram diferentes entre os quatro grupos, e os ácidos graxos livres não-esterificados estão diminuídos no grupo EAo-N em relação ao grupo Sham-N.

Tabela 3. Perfil nutricional dos animais

Variável	Grupo	Dieta		Valor p
		Normo	Hiper	
Peso corporal final (g)	Sham	447 ± 43	447 ± 73	0,97
	EAO	409 ± 30	423 ± 31	0,46
<i>Valor p</i>		0,052	0,21	
Ganho de peso (g)	Sham	140 ± 28	160 ± 52	0,15
	EAO	135 ± 26	152 ± 22	0,22
<i>Valor p</i>		0,73	0,55	
Ingestão alimentar (g/dia)	Sham	29,1 ± 3,6	22,1 ± 3,9	<0,01
	EAO	26,6 ± 2,8	20,5 ± 2,2	<0,01
<i>Valor p</i>		0,07	0,21	
Ingestão calórica (kcal/dia)	Sham	88,9 ± 11,4	85,0 ± 15,0	0,29
	EAO	83,5 ± 8,5	77,9 ± 8,1	0,21
<i>Valor p</i>		0,17	0,11	
Eficiência alimentar (%)	Sham	1,95 ± 0,35	2,49 ± 0,69	<0,01
	EAO	2,00 ± 0,32	2,42 ± 0,31	0,03
<i>Valor p</i>		0,78	0,68	
Gordura corporal total (g)	Sham	19,6 ± 5,9	23,4 ± 9,6	0,14
	EAO	13,1 ± 3,6	24,7 ± 4,8	<0,01
<i>Valor p</i>		0,02	0,61	
Índice de adiposidade	Sham	4,61 ± 1,45	5,13 ± 1,51	0,30
	EAO	3,28 ± 0,75	5,82 ± 1,00	<0,01
<i>Valor p</i>		0,01	0,16	
Glicemia (mg/dL)	Sham	130 ± 9	143 ± 18	0,06
	EAO	125 ± 18	138 ± 17	0,06
<i>Valor p</i>		0,39	0,38	
Triacilglicerol (mg/dL)	Sham	46,4 ± 16,1	46,9 ± 14,2	0,93
	EAO	39,5 ± 15,3	46,8 ± 13,9	0,23
<i>Valor p</i>		0,27	0,99	
Ácidos graxos livres não-esterificados (mmol/L)	Sham	0,35 ± 0,10	0,35 ± 0,04	0,96
	EAO	0,28 ± 0,03	0,33 ± 0,08	0,07
<i>Valor p</i>		0,02	0,46	

Sham-N (n=13): grupo controle com dieta normolipídica; Sham-H (n=12): grupo controle com dieta hiperlipídica; EAO-N (n=11): grupo estenose aórtica com dieta normolipídica; EAO-H (n=14): grupo estenose aórtica com dieta hiperlipídica. Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni, p<0,05.

3.2 – Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

A Tabela 4 mostra a porcentagem de umidade em fragmentos dos ventrículos esquerdo e direito, do pulmão e do fígado nos grupos Sham-N, Sham-H, EAo-N e EAo-H. Não houve diferença estatística entre os quatro grupos, mostrando que os animais com EAo não apresentam retenção hídrica, ou seja, sinais de insuficiência cardíaca.

Tabela 4. Porcentagem (%) de umidade nos tecidos

Variável	Grupo	Dieta		Valor p
		Normo	Hiper	
VE	Sham	75,3 ± 4,0	74,6 ± 1,9	0,46
	EAo	76,4 ± 1,4	76,0 ± 1,2	0,69
Valor p		0,29	0,15	
VD*	Sham	76,0 (70,1; 76,9)	75,4 (73,9; 76,6)	0,86
	EAo	75,9 (74,6; 77,5)	76,6 (74,7; 77,5)	0,52
Valor p		0,33	0,07	
AT	Sham	77,9 ± 1,0	78,2 ± 2,1	0,59
	EAo	77,7 ± 1,4	77,5 ± 1,5	0,73
Valor p		0,75	0,22	
Fígado	Sham	68,1 ± 1,5	66,9 ± 1,9	0,06
	EAo	67,8 ± 1,1	67,4 ± 1,6	0,50
Valor p		0,67	0,43	
Pulmão*	Sham	78,6 (77,3; 82,1)	79,0 (77,3; 88,1)	0,50
	EAo	78,8 (77,2; 80,3)	78,5 (75,7; 80,9)	0,62
Valor p		0,54	0,07	

Sham-N (n=13): grupo controle com dieta normolipídica; Sham-H (n=12): grupo controle com dieta hiperlipídica; EAo-N (n=11): grupo estenose aórtica com dieta normolipídica; EAo-H (n=14): grupo estenose aórtica com dieta hiperlipídica; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrio. Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni, p<0,05. *Dados expressos em mediana e valores mínimo e máximo. Kruskal-Wallis complementado com Dunn, p<0,05.

3.3 – Caracterização da remodelação cardíaca

3.3.1 – Caracterização ecocardiográfica dos grupos Sham e EAo na 6ª semana

Os dados ecocardiográficos dos grupos Sham e EAo obtidos na 6ª semana estão apresentados na Tabela 5. Os animais do grupo EAo apresentaram aumento do AE, AE/AO, Esp. rel. VE, fração de ejeção e % Enc. meso, e diminuição da VEPP e E/A em relação ao grupo Sham.

Tabela 5. Dados ecocardiográficos dos grupos Sham e EAo na 6ª semana

Variáveis	Grupos		Valor p
	Sham (n=8)	EAo (n=25)	
FC (bpm)	326 ± 63	297 ± 24	0,06
AE (mm)	4,94 ± 0,65	5,87 ± 0,71 *	<0,01
AE/AO	1,42 ± 0,19	1,66 ± 0,29 *	0,03
DDVE (mm)	7,15 ± 0,49	6,77 ± 0,61	0,13
Esp. rel. VE	0,40 ± 0,04	0,50 ± 0,07 *	<0,01
Fração de ejeção	0,91 ± 0,02	0,98 ± 0,01 *	<0,01
% Enc. meso	29,6 ± 3,4	37,1 ± 3,0 *	<0,01
VEPP (mm/s)	38,5 ± 3,3	32,9 ± 5,4 *	0,01
E mitral (cm/s)	80,8 ± 6,4	78,3 ± 14,7	0,69
A mitral (cm/s)	52,2 ± 4,5	69,2 ± 21,7	0,07
E/A	1,55 ± 0,06	1,18 ± 0,41 *	0,04

Sham: grupo controle; EAo: grupo estenose aórtica. FC: frequência cardíaca; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AE/AO: relação entre diâmetro do átrio esquerdo e diâmetro da aorta; DDVE: diâmetro diastólico do VE; Esp.rel.VE: espessura relativa da parede do VE; %Enc.meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo (VE); E/A: relação entre onda E e onda A do fluxo transmitral. Dados expressos em média ± desvio padrão, Teste “t” de Student, *p< 0,05.

Na Tabela 6 estão apresentados os dados ecocardiográficos dos grupos EAo, na 6ª semana, antes de receberem a dieta normolipídica (EAo-N) ou a dieta hiperlipídica (EAo-H). Não houve diferença estatística em nenhuma das variáveis analisadas.

Tabela 6. Dados ecocardiográficos dos grupos EAo-N e EAo-H na 6ª semana

Variáveis	Grupos		Valor p
	EAo-N (n=11)	EAo-H (n=14)	
FC (bpm)	292 ± 27	301 ± 22	0,38
AE (mm)	5,87 ± 0,93	5,87 ± 0,51	0,99
AE/AO	1,67 ± 0,33	1,66 ± 0,26	0,89
DDVE (mm)	6,61 ± 0,66	6,90 ± 0,56	0,24
Esp. rel. VE	0,51 ± 0,06	0,50 ± 0,08	0,77
Fração de ejeção	0,98 ± 0,01	0,97 ± 0,01	0,49
% Enc. meso	37,1 ± 2,5	37,0 ± 3,4	0,92
VEPP (mm/s)	32,1 ± 4,2	33,5 ± 6,3	0,56
E mitral (cm/s)	76,9 ± 14,4	79,4 ± 15,4	0,70
A mitral (cm/s)	65,2 ± 23,2	72,3 ± 20,8	0,45
E/A	1,21 ± 0,36	1,16 ± 0,46	0,76

Sham: grupo controle; EAo: grupo estenose aórtica. FC: frequência cardíaca; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AE/AO: relação entre diâmetro do átrio esquerdo e diâmetro da aorta; DDVE: diâmetro diastólico do VE; Esp.rel.VE: espessura relativa da parede do VE; %Enc.meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo (VE); E/A: relação entre onda E e onda A do fluxo transmitral. Dados expressos em média ± desvio padrão, Teste "t" de Student.

3.3.2 – Estrutura e função do coração por ecocardiograma na 18ª semana

Os dados ecocardiográficos dos grupos na 18ª semana estão apresentados na Tabela 7. Os grupos EAo-N e EAo-H apresentaram AE, AE/AO, Esp. rel. VE, fração de ejeção, %Enc. meso e A mitral aumentados em comparação aos grupos Sham-N e Sham-H, respectivamente. O DDVE foi menor no grupo EAo-N vs Sham-N, e a relação E/A foi menor no grupo EAo-H vs Sham-H. A fração de ejeção e % Enc. meso foram menores no grupo EAo-H em relação ao grupo EAo-N.

Tabela 7. Dados ecocardiográficos dos grupos na 18ª semana

Variável	Grupo	Dieta		Valor p
		Normo	Hiper	
FC (bpm)	Sham	293 ± 58	306 ± 37	0,49
	E Ao	272 ± 32	280 ± 45	0,68
Valor p		0,26	0,15	
AE (mm)	Sham	4,99 ± 0,57	5,23 ± 0,39	0,38
	E Ao	6,41 ± 0,85	6,17 ± 0,72	0,36
Valor p		<0,01	<0,01	
AE/AO	Sham	1,29 ± 0,13	1,31 ± 0,08	0,78
	E Ao	1,67 ± 0,18	1,55 ± 0,23	0,08
Valor p		<0,01	<0,01	
DDVE (mm)	Sham	7,84 ± 0,68	7,45 ± 0,53	0,14
	E Ao	7,25 ± 0,73	7,08 ± 0,66	0,51
Valor p		0,03	0,15	
Esp. rel. VE	Sham	0,37 ± 0,03	0,39 ± 0,04	0,24
	E Ao	0,57 ± 0,06	0,57 ± 0,05	0,87
Valor p		<0,01	<0,01	
Fração de ejeção	Sham	0,92 ± 0,03	0,92 ± 0,02	0,97
	E Ao	0,98 ± 0,01	0,96 ± 0,03	0,03
Valor p		<0,01	<0,01	
% Enc. meso	Sham	30,3 ± 3,2	29,3 ± 2,3	0,43
	E Ao	37,3 ± 2,9	32,2 ± 4,1	<0,01
Valor p		<0,01	0,03	
VEPP (mm/s)	Sham	40,7 ± 6,6	36,7 ± 5,4	0,08
	E Ao	38,7 ± 5,8	35,5 ± 4,6	0,16
Valor p		0,39	0,59	
E mitral (cm/s)	Sham	74,0 ± 9,1	75,2 ± 9,6	0,82
	E Ao	77,3 ± 16,6	75,0 ± 8,2	0,62
Valor p		0,52	0,97	
A mitral (cm/s)	Sham	49,2 ± 8,3	46,8 ± 10,5	0,67
	E Ao	62,2 ± 13,7	60,0 ± 15,5	0,67
Valor p		0,03	0,01	
E/A	Sham	1,52 ± 0,16	1,69 ± 0,19	0,22
	E Ao	1,29 ± 0,30	1,28 ± 0,42	0,99
Valor p		0,09	<0,01	

Sham-N (n=13): grupo controle com dieta normolipídica; Sham-H (n=12): grupo controle com dieta hiperlipídica; EAo-N (n=11): grupo estenose aórtica com dieta normolipídica; EAo-H (n=14): grupo estenose aórtica com dieta hiperlipídica. FC: frequência cardíaca; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AE/AO: relação entre diâmetro do átrio esquerdo e diâmetro da aorta; DDVE: diâmetro diastólico do VE; Esp.rel.VE: espessura relativa da parede do VE; %Enc.meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo (VE); E/A: relação entre onda E e onda A do fluxo transmitral. Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni, p<0,05.

3.3.3 – Análise macroscópica do coração *post mortem*

A Tabela 8 mostra a estrutura macroscópica cardíaca *post mortem* dos grupos Sham-N, EAo-N, Sham-H e EAo-H. O peso do VE, do AT e as relações VE/tíbia, AT/tíbia, VE/PCF e AT/PCF foram maiores nos grupos EAo-N e EAo-H vs Sham-N e Sham-H, respectivamente. O peso do VD e as relações VD/tíbia e VD/PCF foram menores no grupo Sham-H em comparação aos grupos Sham-N e EAo-H. A relação AT/PCF foi menor no grupo EAo-H quando comparado ao grupo EAo-N.

Tabela 8. Análise macroscópica cardíaca *post mortem*

Variável	Grupo	Dieta		Valor p
		Normo	Hiper	
VE (g)	Sham	0,81 ± 0,11	0,78 ± 0,09	0,60
	EAO	1,16 ± 0,12	1,16 ± 0,17	0,97
Valor p		<0,01	<0,01	
VD (g)	Sham	0,28 ± 0,07	0,23 ± 0,03	<0,01
	EAO	0,25 ± 0,04	0,27 ± 0,03	0,29
Valor p		0,07	0,03	
AT (g)	Sham	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,49
	EAO	0,17 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,26
Valor p		<0,01	<0,01	
Tíbia (cm)	Sham	4,24 ± 0,07	4,24 ± 0,12	0,99
	EAO	4,18 ± 0,08	4,22 ± 0,10	0,24
Valor p		0,09	0,62	
VE/tíbia (g/cm)	Sham	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,36
	EAO	0,28 ± 0,03	0,27 ± 0,04	0,48
Valor p		<0,01	<0,01	
VD/tíbia (g/cm)	Sham	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,01	<0,01
	EAO	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,42
Valor p		0,11	0,03	
AT/tíbia (g/cm)	Sham	0,02 ± 0,004	0,02 ± 0,005	0,48
	EAO	0,04 ± 0,009	0,04 ± 0,007	0,13
Valor p		<0,01	<0,01	
VE/PCF	Sham	1,81 ± 0,13	1,77 ± 0,17	0,68
	EAO	2,91 ± 0,35	2,79 ± 0,26	0,23
Valor p		<0,01	<0,01	
VD/PCF	Sham	0,61 ± 0,09	0,51 ± 0,05	<0,01
	EAO	0,62 ± 0,10	0,63 ± 0,06	0,72
Valor p		0,63	<0,01	
AT/PCF	Sham	0,23 ± 0,02	0,22 ± 0,03	0,43
	EAO	0,42 ± 0,08	0,37 ± 0,06	0,02
Valor p		<0,01	<0,01	

Sham-N (n=13): grupo controle com dieta normolipídica; Sham-H (n=12): grupo controle com dieta hiperlipídica; EAO-N (n=11): grupo estenose aórtica com dieta normolipídica; EAO-H (n=14): grupo estenose aórtica com dieta hiperlipídica; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso do átrio; VE/tíbia: relação do peso do VE pela tíbia; VD/tíbia: relação do peso do VD pela tíbia; AT/tíbia: relação do peso do AT pela tíbia, VE/PCF: relação do peso do VE pelo peso corporal final; VD/PCF: relação do peso do VD pelo peso corporal final; AT/PCF: relação do peso do AT pelo peso corporal final. Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni, p<0,05.

3.3.4 – Expressão gênica pela técnica de PCR em Tempo Real

As expressões dos genes PGC1 α , PPAR α , FAT/CD36, CPT1 β e MCAD estão apresentadas em valores relativos na Figura 3. A expressão do PGC1 α foi maior no grupo Sham-H vs Sham-N, e o grupo EAo-H apresentou menor expressão deste gene em relação ao Sham-H (Figura 3A). Não houve diferença estatística na expressão gênica do PPAR α entre os quatro grupos (Figura 3B). Os grupos EAo-N e EAo-H apresentaram menor expressão dos genes FAT/CD36, CPT1 β e MCAD quando comparados aos grupos Sham-N e Sham-H, respectivamente (Figuras 3C-3E).

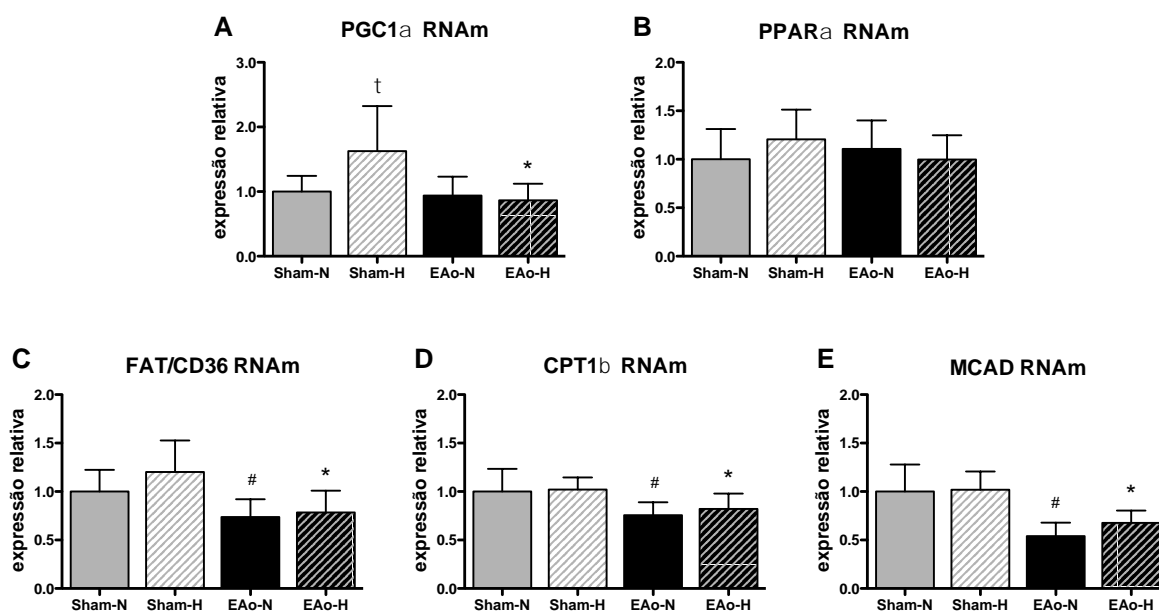


Figura 3. Expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico. Sham-N (n=11): grupo controle com dieta normolipídica; Sham-H (n=10): grupo controle com dieta hiperlipídica; EAo-N (n=9): grupo estenose aórtica com dieta normolipídica; EAo-H (n=10): grupo estenose aórtica com dieta hiperlipídica. Dados expressos em média \pm desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni. # $p < 0,05$ EAo-N x Sham-N; * $p < 0,05$ EAo-H x Sham-H; ^t $p < 0,05$ Sham-H x Sham-N.

3.3.5 – Atividade das enzimas de vias metabólicas

A atividade da hexoquinase e da fosfofrutoquinase está significativamente aumentada nos grupos EAo comparados com os Sham (Figuras 4A e 4B). A

atividade enzimática da citrato sintase foi maior no Sham-H vs Sham-N (Figura 4C), e a atividade da OHADH foi maior no EAo-H vs Sham-H (Figura 4D).

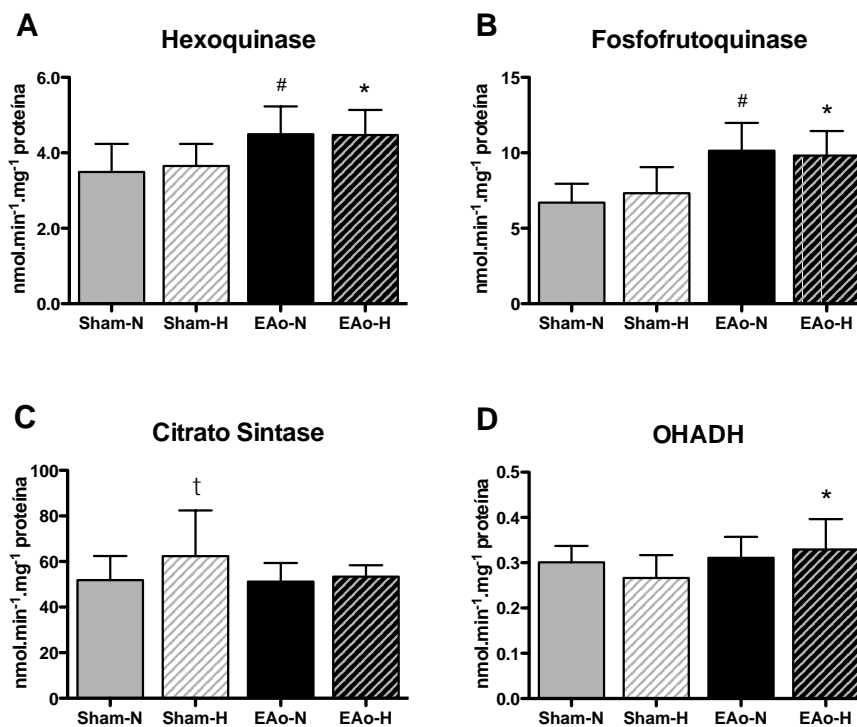


Figura 4. Atividade de enzimas metabólicas. Sham-N (n=11): grupo controle com dieta normolipídica; Sham-H (n=11): grupo controle com dieta hiperlipídica; EAo-N (n=11): grupo estenose aórtica com dieta normolipídica; EAo-H (n=13): grupo estenose aórtica com dieta hiperlipídica. Dados expressos em média \pm desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni. [#] $p < 0,05$ EAo-N x Sham-N; ^{*} $p < 0,05$ EAo-H x Sham-H; [†] $p < 0,05$ Sham-H x Sham-N.

3.3.6 – Expressão proteica pela técnica de Western Blot

Os gráficos da expressão proteica do PPAR α , PGC1 α , CD36, CPT1 β e MCAD estão apresentados na Figura 5. Não houve diferença estatística entre os quatro grupos na expressão do PGC1 α (Figura 5A), PPAR α (Figura 5B), CPT1 β (Figura 5D) e MCAD (Figura 5E). A expressão do CD36 foi menor no grupo EAo-H em relação ao Sham-H (Figura 5C).

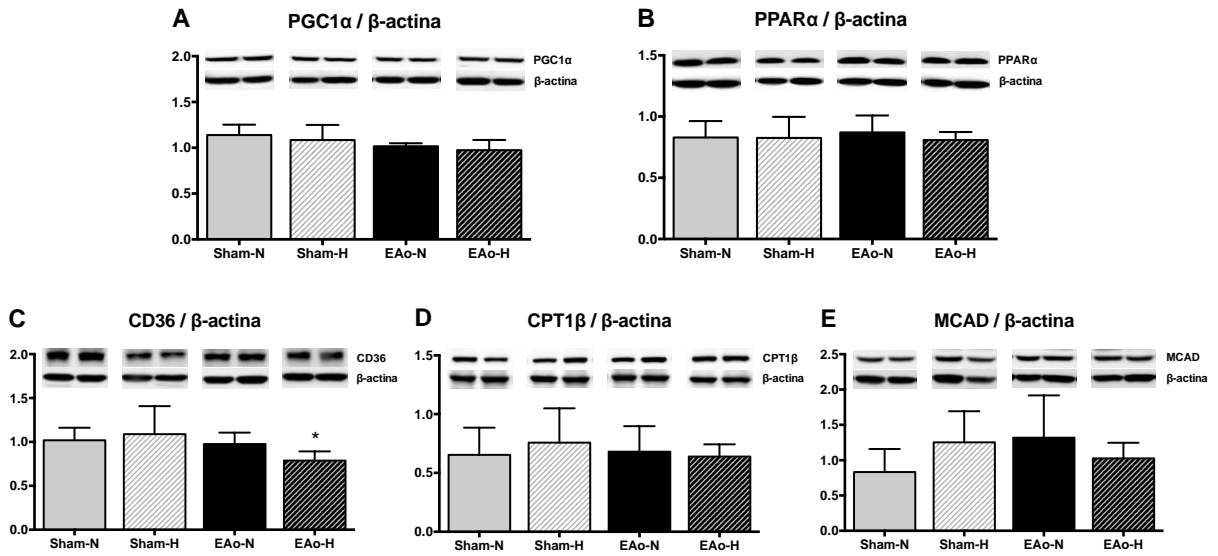


Figura 5. Expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico. Sham-N: grupo controle com dieta normolipídica; Sham-H: grupo controle com dieta hiperlipídica; EAo-N: grupo estenose aórtica com dieta normolipídica; EAo-H: grupo estenose aórtica com dieta hiperlipídica. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n=6/grupo). ANOVA complementada com Bonferroni. * $p < 0,05$ EAo-H x Sham-H.

Não houve diferença entre os grupos na expressão proteica dos sensores de estresse metabólico (Figura 6).

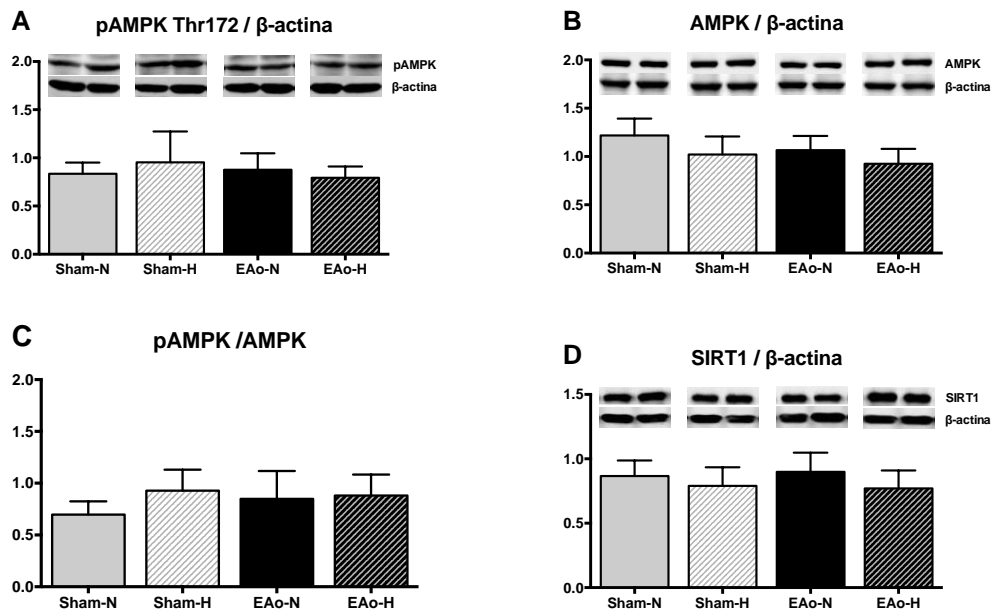


Figura 6. Expressão proteica de sensores metabólicos. Sham-N: grupo controle com dieta normolipídica; Sham-H: grupo controle com dieta hiperlipídica; EAo-N: grupo estenose aórtica com dieta normolipídica; EAo-H: grupo estenose aórtica com dieta hiperlipídica. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n=6/grupo). ANOVA complementada com Bonferroni.

Também não houve diferença entre os grupos na expressão proteica do LDH e PDH (Figuras 7A e 7B).

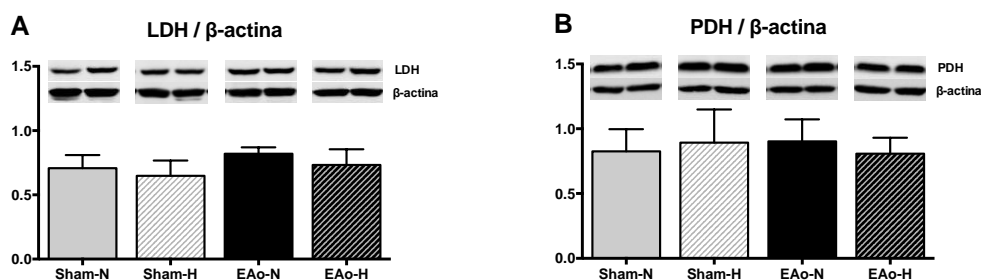


Figura 7. Expressão proteica de enzimas relacionadas ao metabolismo. Sham-N: grupo controle com dieta normolipídica; Sham-H: grupo controle com dieta hiperlipídica; EAo-N: grupo estenose aórtica com dieta normolipídica; EAo-H: grupo estenose aórtica com dieta hiperlipídica. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n=6/grupo). ANOVA complementada com Bonferroni.

3.3.7 – Relações intracelulares AMP/ATP e NAD⁺/NADH

Primeiramente fizemos a extração e análise de 2 animais por grupo e, como os resultados não foram consistentes com as concentrações esperadas de ATP, ADP e AMP no coração (Tabela 9), decidimos não continuar a análise. Os nucleotídeos de adenina fosfato são compostos de alta energia e muito sensíveis à degradação. Mesmo tendo nossas amostras congeladas com segurança a -80°C, o tempo necessário para a retirada e dissecação do coração no momento da eutanásia pode ter sido a razão para a perda dos nucleotídeos de adenina fosfato no tecido.

Tabela 9. Determinação dos nucleotídeos de adenina fosfato por HPLC

	AMP	ADP	ATP
Sham-N	1,26 \pm 0,18	1,32 \pm 0,04	0,17 \pm 0,07
Sham-H	1,71 \pm 0,22	1,30 \pm 0,25	0,28 \pm 0,13
EAo-N	1,72 \pm 0,04	1,28 \pm 0,06	0,27 \pm 0,02
EAo-H	2,25 \pm 0,22	1,22 \pm 0,14	0,19 \pm 0,05

Valores expressos em média μ mol/g (tecido seco) \pm erro padrão. n=2/grupo.

Para referência das concentrações esperadas no coração, a tabela abaixo foi copiada do artigo “M.G. Volonté et al. Development of an HPLC method for determination of metabolic compounds in myocardial tissue. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;35:647-653.” e compara as concentrações médias destes compostos metabólicos no miocárdio de ratos expostos à perfusão e isquemia, resultados expressos em $\mu\text{mol/g}$ (tecido seco) \pm erro padrão.

Table 5

Results reported in bibliography, expressed as mean $\mu\text{mol g}^{-1}$ (dry weight) \pm S.E.M., with other HPLC methods in perfused and ischemic hearts (see references).

Reference	Cr	CrP	HX	AMP	Ad	ADP	ATP
Sellekvold et al. [1] control perfusion	46.2 \pm 1.1	35.5 \pm 1.0	^a	1.4 \pm 0.1	^a	4.6 \pm 0.1	26.6 \pm 0.4
Sellekvold et al. [1] ischemia (20 min)	65.8 \pm 2.4	1.9 \pm 0.2	^a	8.7 \pm 0.7	^a	7.9 \pm 0.6	4.7 \pm 0.3
Harmsen et al. [20] control perfusion	^a	27.5 \pm 2.8	^a	0.5 \pm 0.2	^a	4.8 \pm 0.3	22.9 \pm 1.2
Harmsen et al. [20] ischemia (20 min)	^a	13.4 \pm 1.9	^a	1.4 \pm 0.6	^a	5.8 \pm 1.1	15.8 \pm 2.8
Humphrey et al. [21] control perfusion	38.2 \pm 1.5	23.6 \pm 0.9	0.03 \pm 0.01	1.1 \pm 0.1	0.05 \pm 0.01	5.7 \pm 0.2	22.5 \pm 0.6
Humphrey et al. [21] (ischemia, 25 min)	70.1 \pm 2.1	2.5 \pm 0.3	1.4 \pm 0.1	12.3 \pm 0.5	4.3 \pm 0.2	4.6 \pm 0.2	3.1 \pm 0.4

^a Not supplied.

Os níveis cardíacos de NAD^+/NADH não foram diferentes entre os grupos (Figura 8).

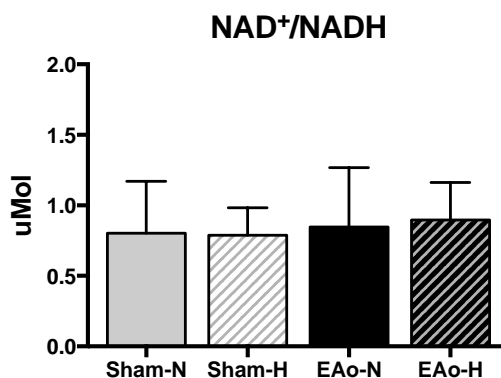


Figura 8. Relação de NAD^+/NADH cardíaco. Dados expressos em média \pm desvio padrão (n=5/grupo).

3.3.8 – Conteúdo de triacilglicerol cardíaco

O conteúdo de triacilglicerol (TAG) está significativamente reduzido no grupo EAo-N em relação ao Sham-N ($1,77 \pm 0,15$ vs $2,61 \pm 0,28$; $p < 0,05$), e teve uma diminuição de 23% no grupo EAo-H em relação ao Sham-H ($1,81 \pm 0,12$ versus $2,36 \pm 0,10$; $p = 0,062$) (Figura 9).

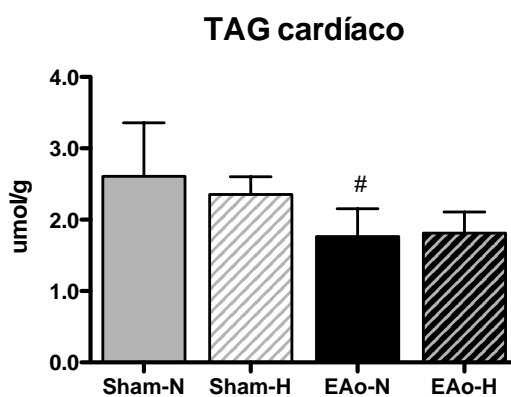


Figura 9. Conteúdo de TAG cardíaco. Dados expressos em média \pm desvio padrão (Sham-N, n= 7; Sham-H, n=6; EAo-N, n=7; EAo-H, n=6). # $p < 0,05$ EAo-N x Sham-N.

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

4.1- Dieta hiperlipídica

Trabalhos anteriores do nosso laboratório que utilizaram dietas com alto teor de gordura apresentaram diminuição na quantidade de carboidratos quando comparadas às dietas padrão⁽⁶⁴⁾; esse desequilíbrio de carboidratos entre as duas dietas poderia dificultar a conclusão do fator responsável pelos resultados observados nos estudos. Esse mesmo viés metodológico é encontrado em trabalhos da literatura mundial^(57-60,62,63). Com a finalidade de avaliar o efeito isolado do aumento de lipídios, utilizamos nesse estudo dietas normolipídica e hiperlipídica insaturada com equilíbrio na quantidade de carboidratos em gramas (Tabela 1), o que nos permite inferir que os resultados observados foram decorrentes da influência do aumento de gordura. Os ácidos graxos do tipo insaturado, como referido anteriormente na introdução, estão associados a efeitos benéficos ao sistema cardiovascular⁽⁵⁶⁾.

4.2- Perfil nutricional na 18ª semana

Ao final do experimento, o peso corporal não foi diferente entre os grupos, entretanto o grupo EAo-N apresentou menor quantidade de gordura corporal total em relação ao Sham-N. Considerando que a ingestão calórica foi semelhante nos dois grupos, podemos inferir que a progressão da EAo acarretou maior gasto energético, diminuindo a gordura corporal e o índice de adiposidade. Levando em consideração que a concentração plasmática dos ácidos graxos livres não-esterificados (NEFA) está diminuída no EAo-N, podemos hipotetizar que a queda dos depósitos de gordura foi resultante de uma diminuição da síntese de triacilglicerol tecidual, provavelmente porque os ácidos graxos estão sendo mais metabolizados. A dieta hiperlipídica preveniu a perda de gordura corporal no grupo

EAO-H em comparação com o EAO-N, o que pode ser explicado pelo efeito térmico dos alimentos, visto que os lipídios necessitam de baixa quantidade de energia (2-3% do gasto energético total) para serem metabolizados; portanto, os lipídios que não são necessários na produção de energia são depositados na forma de triglicérides nos adipócitos.

4.3- Estrutura e função por ecocardiograma na 6ª semana

Como a proposta deste estudo foi iniciar os tratamentos dietéticos em animais com EAO e alterações de estrutura e função cardíaca, tornou-se necessária a avaliação *in vivo* desses ratos na 6ª semana para comprovar se a EAO promoveu RC. Os dados ecocardiográficos (Tabela 5) mostraram que a EAO levou à alteração estrutural do tipo hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo, aumento do átrio esquerdo, disfunção diastólica e melhoria da função sistólica. Os dados estruturais e a análise dos parâmetros relacionados com a função sistólica estão de acordo com dados de diversos autores^(3,11,12,13,16). Neste estudo o comportamento da relação E/A, um dos indicadores de função diastólica, foi semelhante a Mendes *et al*⁽³⁾ e Litwin *et al*⁽¹⁶⁾, mas diferiu de Gonçalves *et al*⁽¹¹⁾, Bregagnollo *et al*⁽¹²⁾ e Ribeiro *et al*⁽¹³⁾ onde se observou que essa variável não se alterou nos animais EAO com 6 semanas. Com a finalidade de iniciar o tratamento dietético nos animais com EAO, foram formados dois grupos homogêneos (Tabela 6) que nos permite inferir com segurança que as possíveis diferenças nos resultados ao final do experimento na 18ª semana não foram consequência de grupos diferentes.

4.4- Estrutura e função por ecocardiograma na 18ª semana

Os achados estruturais ecocardiográficos foram compatíveis com a macroscopia cardíaca *post mortem*, isto é, hipertrofia ventricular esquerda e atrial nos grupos EAO em relação ao Sham. O estímulo para essa remodelação cardíaca

ocorre por fatores mecânicos e bioquímicos que agem nos receptores, canais iônicos e integrinas presentes na membrana sarcolemal, ativando sinalizadores bioquímicos citosólico responsáveis por alterações na expressão gênica e aumento na síntese proteica⁽⁴⁾. Em relação a função cardíaca, na 18ª semana os grupos EAO mantiveram a disfunção diastólica, semelhante a outros trabalhos^(3,14,15), e a melhora do desempenho sistólico, como observado na 6ª semana, ou seja, não houve piora da performance cardíaca. O comportamento da função sistólica contrasta com os dados dos outros trabalhos que mostraram deterioração na 18ª semana^(3,14,15). Embora tenha sido utilizado a mesma metodologia, os resultados contrastantes podem estar relacionados à participação de investigadores com diferentes níveis de treinamento no preparo do clip, ato cirúrgico, avaliação ecocardiográfica e individualidade biológica dos animais.

O tratamento com a dieta rica em gordura por 12 semanas não teve nenhum efeito sobre a estrutura e função cardíaca diastólica. Embora a dieta hiperlipídica tenha acarretado uma queda estatisticamente significativa na fração de ejeção e na % de encurtamento mesocárdico no grupo EAO-H vs EAO-N, a função sistólica do grupo EAO-H continua melhor que a do grupo Sham-H.

Não encontramos trabalhos na literatura com semelhante delineamento experimental para fins de comparação. Os autores que avaliaram o efeito de dieta hiperlipídica na progressão da RC por sobrecarga pressórica iniciaram o tratamento logo após a cirurgia e apresentaram resultados contraditórios, não alterando⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾ ou atenuando a remodelação estrutural e/ou funcional cardíaca^(57,58,62,63). A divergência pode ser resultante da variação nos modelos experimentais, tipos de dietas, duração e momento de tratamento e parâmetros analisados.

4.5- Metabolismo energético miocárdico

Neste trabalho, hipotetizamos que o aumento na oferta de ácidos graxos insaturados atenua a queda no metabolismo lipídico pela ativação do PPAR α , aumentando a expressão de proteínas envolvidas na captura e oxidação dos lipídios; essa mudança atenua ou retarda a disfunção metabólica e a mecânica que ocorrem durante a progressão da remodelação cardíaca.

Nossos dados mostram que os genes relacionados com a captura e oxidação de lipídios (CD36, CPT1 β , MCAD) estão diminuídos, porém a expressão das respectivas proteínas, assim como a expressão gênica e proteica do PPAR α e do PGC1 α não foram alteradas no miocárdio dos animais EAo-N em relação ao Sham-N. O conteúdo de TAG miocárdico está diminuído e não houve alteração na atividade da enzima relacionada com a beta oxidação (OHADH). Houve aumento da atividade das enzimas relacionadas com a glicólise (hexoquinase e fosfofrutoquinase), não acompanhado de aumento na atividade da citrato sintase e na expressão proteica da piruvato e lactato desidrogenase. Também não foram encontradas diferenças na expressão proteica dos sensores SIRT1, AMPK, pAMPK Thr172 e na relação NAD⁺/NADH.

Trabalhos na literatura mostram que na hipertrofia por sobrecarga pressórica o metabolismo energético cardíaco reverte para o estado fetal, que corresponde a diminuição na oxidação de ácidos graxos e aumento na utilização de glicose para geração de ATP, com um decréscimo global do metabolismo oxidativo^(23,24,67-70). O aumento na utilização da glicose parece ser um processo adaptativo em que o miócito utiliza mais glicose do que ácidos graxos, por ser um substrato mais eficiente na produção de ATP por molécula de oxigênio (glicose: 3,17 ATP/O₂ e ácidos graxos: 2,83 ATP/O₂)^(23,24). O desvio metabólico decorre da

diminuição dos fatores transcricionais, PPAR α e PGC1 α , e redução nos transportadores de ácidos graxos (FABP, CD36, CPT1 β)⁽⁴⁸⁻⁵¹⁾. A insuficiência energética resultante leva à ativação de sensores energéticos, como a AMPK, que contribui para aumentar a captação da glicose e estimular a enzima fosfofrutoquinase da glicólise^(46,52,53,71); entretanto, a elevação da captação não é proporcional à oxidação mitocondrial, que pode estar diminuída ou inalterada⁽⁷¹⁾. A literatura também mostra que na hipertrofia por sobrecarga pressórica o conteúdo de triacilglicerol miocárdico encontra-se reduzido⁽⁷²⁻⁷⁴⁾.

Embora os achados acima são descritos como alterações decorrentes de hipertrofia por sobrecarga pressórica, o momento em que ocorre o desvio metabólico, ou seja, queda na oxidação dos ácidos graxos e aumento na glicólise, acontece principalmente na fase em que há disfunção ventricular importante com redução da fração de ejeção^(26-28,68-70). E existe um consenso na literatura que, independente do modelo experimental, o desvio metabólico com redução da oxidação mitocondrial está presente nas fases mais avançadas de insuficiência cardíaca⁽⁷⁵⁾. Neste trabalho, esperava-se que após 18 semanas de estenose aórtica os animais apresentassem deterioração da função sistólica, o que não ocorreu; esse fato pode explicar os dados que mostram a preservação parcial do metabolismo lipídico, desde que não houve alteração na beta oxidação e nas proteínas relacionadas com a captação dos ácidos graxos; houve redução apenas do triacilglicerol (TAG) miocárdico e da expressão de genes lipídicos (CD36, CPT1 β , MCAD). A queda do TAG é resultante de um desbalanço entre a síntese e a lipólise desse lipídio, com conseqüente oxidação do ácido graxo livre ou formação de compostos intermediários (diacilglicerol, ceramida, fosfolipídios)⁽⁷⁶⁾. O mecanismo envolvido na redução do TAG miocárdico na sobrecarga pressórica não está

claro⁽⁷⁴⁾. A diminuição na expressão desses genes regulados pelo PPAR α na hipertrofia por sobrecarga pressórica é consistente com a literatura^(21,77) e, sugere o início da reprogramação metabólica lipídica. A razão da tradução dos respectivos genes estar normal, apesar do RNAm estar diminuído, é devido ao maior tempo de vida do RNAm no citoplasma que pode ser repetidamente lido pelos ribossomos⁽⁷⁸⁾.

A dieta hiperlipídica não teve nenhum efeito nos animais com EAo em relação ao metabolismo energético cardíaco. A nossa hipótese era que a hipertrofia por sobrecarga pressórica acarretaria queda do PPAR α e, conseqüentemente, do metabolismo lipídico, e o tratamento com a dieta atenuaria essas modificações. Nossos dados mostram que houve redução na transcrição dos genes (CD36, CPT1 β , MCAD) regulados pelo PPAR α , embora os níveis deste fator transcricional juntamente com seu coativador PGC1 α estejam normais nos animais EAo-N. Os mecanismos moleculares responsáveis pela diminuição da transcrição podem estar relacionados com a inibição da atividade do complexo PPAR α /PGC1 α na região promotora do DNA através de baixos níveis do seu parceiro heterodimérico, o receptor X retinóide (RXR), e da fosforilação direta das vias da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK)^(39,79). De acordo com a literatura, a ligação do complexo PPAR α /RXR ao DNA está diminuída na hipertrofia por sobrecarga pressórica^(51,79), assim como na hipóxia^(80,81) e na doença isquêmica cardíaca^(82,83). A inativação da ligação deste complexo ao DNA nesses modelos, que têm em comum uma limitação da disponibilidade de oxigênio, sugere que este fator poderia ser o responsável pelo fenômeno. A dieta hiperlipídica não foi capaz de estimular este complexo PPAR α /PGC1 α /RXR e prevenir a queda dos genes CD36, CPT1 β , MCAD observada no grupo EAo-N; isto ocorreu porque o ácido graxo livre não foi capaz de alterar a programação celular que levou às

alterações intrínsecas deste complexo, que são decorrentes, provavelmente, da baixa disponibilidade de oxigênio. A favor dessa hipótese, os dados de outras investigações do nosso grupo revelam que os animais com 18 semanas de estenose aórtica apresentam transição da isoforma V1(α) para V3(β) das cadeias pesadas de miosina (MyHC)⁽⁸⁴⁾, diminuição da bomba de cálcio do retículo endoplasmático (SERCA2a)⁽⁸⁴⁾ e aumento do fator induzível de hipóxia-1 α (HIF-1 α) (dados não publicados), sugerindo que nesse modelo deve existir um déficit energético no miocárdio hipertrofiado consequente ao déficit de oxigênio. Entretanto, o entendimento dos mecanismos que induzem a ativação da programação fetal e o nível regulatório no qual essas mudanças ocorrem permanece limitado.

Estudos que avaliaram a relação entre metabolismo energético miocárdico e dieta hiperlipídica em modelos experimentais de remodelação cardíaca por sobrecarga pressórica apresentaram resultados divergentes, não alterando⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾ ou melhorando⁽⁶⁰⁻⁶²⁾ as variáveis envolvidas no metabolismo energético lipídico. Não encontramos trabalhos na literatura com delineamento experimental semelhante à deste trabalho para fins de comparação; nos estudos citados acima, a administração da dieta hiperlipídica ocorreu concomitantemente à cirurgia, além disso, as composições das dietas e o tempo de tratamento foram diferentes do nosso protocolo.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Em contraste com a nossa hipótese, durante a evolução da remodelação cardíaca, os animais com estenose aórtica apresentaram alteração parcial no metabolismo lipídico miocárdico e não tiveram piora da função cardíaca. A dieta hiperlipídica insaturada não teve efeito no processo metabólico e na função cardíaca desses animais. Os mecanismos no qual a dieta hiperlipídica não foi capaz estimular o PPAR α nos animais com estenose aórtica são desconhecidos.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

- 1) Cohn JN, Ferrarri R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:562-582.
- 2) Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation.* 2000;102:470-479.
- 3) Mendes OC, Campos DHS, Damatto RL, Sugizaki MM, Padovani CR, Okoshi K, et al. Remodelamento cardíaco: análise seriada e índices de detecção precoce de disfunção ventricular. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94:62-70.
- 4) Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. História natural da remodelação miocárdica: da agressão aos sintomas. *Rev Soc Cardiol do Estado de São Paulo.* 2000;10:8-16.
- 5) Bregagnollo EA, Mestrinel MA, Okoshi K, Carvalho FC, Bregagnollo IF, Padovani CR, et al. Papel relativo da remodelação geométrica do ventrículo esquerdo, morfológica e funcional do miocárdio na transição da hipertrofia compensada para a falência cardíaca em ratos com estenose aórtica supra-avalvar. *Arq Bras Cardiol.* 2007;88:225-233.
- 6) Boluyt MO, Robinson KG, Meredith AL, Sem S, Lakatta EG, Crow MT, et al. Heart failure after long-term supra-avalvar aortic constriction in rats. *Am J Hypertens.* 2005;18:202-212.
- 7) Okoshi MP, Matsubara LS, Franco M, Cicogna AC, Matsubara BB. Myocyte necrosis the basis for fibrosis in renovascular hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res.* 1997;30:1135-1144.
- 8) Rodrigues MAM, Bregagnollo EA, Montenegro MR, Tucci PJF. Coronary vascular and myocardial lesions due to experimental constriction of the abdominal aorta. *Int J Cardiol.* 1992;35:253-257.

- 9) Bing OHL, Brooks WW, Robinson KG, Slawsky MT, Hayes JA, Litwin SE, et al. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:383-396.
- 10) Bregagnollo EA, Zornoff LAM, Okoshi K, Sugizaki M, Mestrinel MA, Padovani CR, et al. Myocardial contractile dysfunction contributes to the development of heart failure in rats with aortic stenosis. *Int J Cardiol.* 2006;113:188-193.
- 11) Gonçalves G, Zornoff LAM, Ribeiro HB, Okoshi MP, Cordaro FRS, Okoshi K, et al. O bloqueio do sistema renina-angiotensina atenua a remodelação cardíaca de ratos submetidos a estenose aórtica. *Arq Bras Cardiol.* 2005;84:304-308.
- 12) Bregagnollo EA, Okoshi K, Bregagnollo IF, Okoshi MP, Padovani CR, Cicogna AC. Effects of the prolonged inhibition of the angiotensin-converting enzyme on the morphological and functional characteristics of left ventricular hypertrophy in rats with persistent pressure overload. *Arq Bras Cardiol.* 2005;84:225-232.
- 13) Ribeiro HB, Okoshi K, Cicogna AC, Bregagnollo EA, Rodrigues MAM, Padovani CR, et al. Estudo evolutivo da morfologia e função cardíaca em ratos submetidos a estenose aórtica supraavalar. *Arq Bras Cardiol.* 2003;81:562-568.
- 14) Pacagnelli FL, Okoshi K, Campos DHS, Souza RWA, Padovani CR, Carvalho RF, et al. Physical training attenuates cardiac remodeling in rats with supra-aortic stenosis. *Exp Clin Cardiol.* 2014;20:3889–3905.
- 15) Gomes MJ, Martinez PF, Campos DHS, Pagan LU, Bonomo C, Lima ARR, et al. Beneficial Effects of Physical Exercise on Functional Capacity and Skeletal Muscle Oxidative Stress in Rats with Aortic Stenosis-Induced Heart Failure. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;8695716.
- 16) Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell HB, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in

rats with pressure overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation*. 1995;91:2642-2654.

17) Allard MF. Energy Substrate Metabolism in Cardiac Hypertrophy. *Curr Hypertens Rep*. 2004;6:430-435.

18) Sambandam N, Lopaschuk GD, Brownsey RW, Allard MF. Energy Metabolism in the Hypertrophied Heart. *Heart Fail Rev*. 2002;7:161-173.

19) Jameel MN, Zhang J. Myocardial Energetics in Left Ventricular Hypertrophy. *Curr Cardiol Rev*. 2009;5:243-250.

20) Azevedo PS, Minicucci MF, Santos PP, Paiva SA, Zornoff LA. Energy metabolism in cardiac remodeling and heart failure. *Cardiol Rev*. 2013;21:135-140

21) Degens H, de Brouwer KF, Gilde AJ, Lindhout M, Willemsen PH, Janssen BJ, et al. Cardiac fatty acid metabolism is preserved in the compensated hypertrophic rat heart. *Basic Res Cardiol*. 2006;101:17-26.

22) Kato T, Niizuma S, Inuzuka Y, Kawashima T, Okuda J, Tamaki Y, et al. Analysis of metabolic remodeling in compensated left ventricular hypertrophy and heart failure. *Circ Heart Fail*. 2010;3:420-430.

23) Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CDL, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2010;90:207–258.

24) Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*. 2005;85:1093-1129.

25) Tian Q, Barger PM. Deranged Energy Substrate Metabolism in the Failing Heart. *Curr Hypertens Rep*. 2006;8:465-471.

26) Turer AT, Malloy CR, Newgard CB, Podgoreanu MV. Energetics and Metabolism in the Failing Heart- Important But poorly understood. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010;13:458-465.

- 27) van Bilsen M, Smeets PJ, Gilde AJ, van der Vusse GJ. Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome?. *Cardiovasc Res.* 2004;61:218-226.
- 28) Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. Cardiac Metabolism in Heart Failure - Implications beyond ATP production. *Circ Res.* 2013; 113: 709-724.
- 29) Augustus AS, Kako Y, Yagyu H, Goldberg IJ. Routes of FA delivery to cardiac muscle: modulation of lipoprotein lipolysis alters uptake of TG-derived FA. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284:331-339.
- 30) Teusink B, Voshol PJ, Dahlmans VE, Rensen PC, Pijl H, Romijn JA, et al. Contribution of fatty acids released from lipolysis of plasma triglycerides to total plasma fatty acid flux and tissue-specific fatty acid uptake. *Diabetes.* 2003;52:614-620.
- 31) Depre C, Vanoverschelde JL, Taegtmeyer H. Glucose for the heart. *Circulation.* 1999;99:578-588.
- 32) Lopaschuk GD, Folmes CD, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res.* 2007;101:335-347.
- 33) Nuutila P, Koivisto VA, Knutti J, Routsalainen U, Teras M, Haaparanta M, et al. Glucose-free fatty acid cycle operates in human heart and skeletal muscle in vivo. *J Clin Invest.* 1992;89:1767-1774.
- 34) Peterson LR, Herrero P, Schechtman KB, Racette SB, Waggoner AD, Kisrieva-Ware Z, et al. Effect of obesity and insulin resistance on myocardial substrate metabolism and efficiency in young women. *Circulation.* 2004;109:2191-2196.
- 35) Koustsari C, Jensen MD. Thematic review series: patient-oriented research. Free fatty acid metabolism in human obesity. *J Lipid Res.* 2006;47:1643-1650.
- 36) Szczepaniak LS, Dobbins RL, Metzger GJ, Sartoni-D'Ambrosia G, Arbique D, Vongpatanasin W, et al. Myocardial triglycerides and systolic function in humans: in

vivo evaluation by localized proton spectroscopy and cardiac imaging. *Magn Reson Med.* 2003;49:417-423.

37) Mazumder PK, O'Neill BT, Roberts MW, Buchanan J, Yun UJ, Cooksey RC, et al. Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes.* 2004;53:2366-2374.

38) Huss JM, Kelly DP. Nuclear Receptor Signaling and Cardiac Energetics. *Circ Res.* 2004;95:568-578.

39) Duncan JG, Finck BN. The PPAR α -PGC-1 α axis controls cardiac energy metabolism in healthy and diseased myocardium. *PPAR Res.* 2008;2008:253817.

40) Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovasc Res.* 2008;79:208-217.

41) Rowe GC, Jiang A, Arany Z. PGC-1 Coactivators in Cardiac Development and Disease. *Circ Res.* 2010;107:825-838.

42) Cantó C, Auwerx J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol.* 2009;20:98-105.

43) Lomb DJ, Laurent G, Haigis MC. Sirtuins regulate key aspects of lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1804:1652-1657.

44) Tanno M, Kuno A, Horio Y, Miura T. Emerging beneficial roles of sirtuins in heart failure. *Basic Res Cardiol.* 2012;107:273.

45) An D, Pulinilkunil T, Qi D, Ghosh S, Abrahani A, Rodrigues B. The metabolic "switch" AMPK regulates cardiac heparin-releasable lipoprotein lipase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288:246-253.

46) Sambandam N, Lopaschuk GD. AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart. *Prog Lipid Res.* 2003;42:238-256.

- 47) Lehman JJ, Kelly DP. Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29:339-345.
- 48) Arany Z, Novikov M, Chin S, Ma Y, Rosenzweig A, Spiegelman BM. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:10086-10091.
- 49) Garnier A, Fortin D, Deloménie C, Momken I, Veksler V, Ventura-Clapier R. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol*. 2003;551:491-501.
- 50) Barger PM, Brandt JM, Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during cardiac hypertrophic growth. *J Clin Invest*. 2000;105:1723-1730.
- 51) Kanda H, Nohara R, Hasegawa K, Kishimoto C, Sasayama S. A nuclear complex containing PPARa/RXRa is markedly downregulated in the hypertrophied rat left ventricular myocardium with normal systolic function. *Heart Vessels*. 2000;15:191-196.
- 52) Tian R, Musi N, D'Agostino J, Hirshman MF, Goodyear LJ. Increased adenosine monophosphate-activated protein kinase activity in rat hearts with pressure-overload hypertrophy. *Circulation*. 2001;104:1664-1669.
- 53) Allard MF, Parsons HL, Saeedi R, Wambolt RB, Brownsey R. AMPK and metabolic adaptation by the heart to pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H140-148.
- 54) Alcendor RR, Kirshenbaum LA, Imai S, Vatner SF, Sadoshima J. Silent information regulator 2alpha, a longevity factor and class III histone deacetylase, is an essential endogenous apoptosis inhibitor in cardiac myocytes. *Circ Res*.

2004;95:971-980.

55) Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ. Res.* 2007;100:1512-1521.

56) Chess DJ, Stanley WC. Role of diet and fuel overabundance in the development and progression of heart failure. *Cardiovasc Res.* 2008;79:269-278.

57) Duda MK, O'Shea KM, Lei B, Barrows BR, Azimzadeh AM, McElfresh TE, et al. Dietary supplementation with w-3 PUFA increases adiponectin and attenuates ventricular remodeling and dysfunction with pressure overload. *Cardiovasc Res.* 2007;76:303-310.

58) Duda MK, O'Shea KM, Lei B, Barrows BR, Azimzadeh AM, McElfresh TE, et al. Low-carbohydrate/high fat diet attenuates pressure overload-induced ventricular remodeling and dysfunction. *J Card Fail.* 2008;14:327-335.

59) Chess DJ, Lei B, Hoit BD, Azimzadeh AM, Stanley WC. Effects of a high saturated fat diet on cardiac hypertrophy and dysfunction in response to pressure overload. *J Card Fail.* 2008;14:82-88.

60) Chess DJ, Khairallah RJ, O'Shea KM, Xu W, Stanley WC. A high-fat diet increases adiposity but maintains mitochondrial oxidative enzymes without affecting development of heart failure with pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297:H1585-H1593.

61) Akki A, Seymour AM. Western diet impairs metabolic remodelling and contractile efficiency in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2009;81:610-617.

62) Okere IC, Young ME, McElfresh TA, Chess DJ, Sharov VG, Sabbah HN, et al. Low Carbohydrate/High-Fat Diet Attenuates Cardiac Hypertrophy, Remodeling, and Altered Gene Expression in Hypertension. *Hypertension.* 2006;48:1116-1123.

63) Okere IC, Chess DJ, McElfresh TA, Johnson J, Rennison J, Ernsberger P, et al.

High fat diet prevents cardiac hypertrophy and improves contractile function in the hypertensive dahl salt-sensitive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32:825-831.

64)

65) Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RA, Nogueira C et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008; 52(6): 968-974.

66) Bak MI, Ingwall JS. Acidosis during ischemia promotes adenosine triphosphate resynthesis in postischemic rat heart. In vivo regulation of 5'-nucleotidase. *J Clin Invest*. 1994;93:40-49.

67) Taegtmeyer H, Sen S, Vela D. Return to the fetal gene program: A suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1188:191-198.

68) Kienesberger, Petra C. Myocardial Metabolic Abnormalities and Cardiac Dysfunction. In: Jagadeesh, Gowraganahalli; Balakumar, Pitchai; Maung-U, Khin. *Pathophysiology and Pharmacotherapy of Cardiovascular Disease*. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. P. 325-341.

69) Nickel A1, Löffler J, Maack C. Myocardial energetics in heart failure. *Basic Res Cardiol*. 2013;108:358.

70) Doenst T, Pytel G, Schrepper A, Amorim P, Färber G, Shingu Y, et al. Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. *Cardiovasc Res*. 2010;86:461–470.

71) Kolwicz Jr SC, Tian R. Glucose metabolism and cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2011;90:194–201.

72) Perona JS, Ruiz-Gutierrez V. Triacylglycerol molecular species are depleted to different extents in the myocardium of spontaneously hypertensive rats fed two oleic

acid-rich oils. *Am J Hypertens.* 2005;18:72-80.

73) Pound KM, Sorokina N, Ballal K, Berkich DA, Fasano M, Lanoue KF, et al. Substrate-enzyme competition attenuates upregulated anaplerotic flux through malic enzyme in hypertrophied rat heart and restores triacylglyceride content: attenuating upregulated anaplerosis in hypertrophy. *Circ Res.* 2009;104:805-812.

74) O'Donnell JM, Fields AD, Sorokina N, Lewandowski ED. The absence of endogenous lipid oxidation in early stage heart failure exposes limits in lipid storage and turnover. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44:315-322.

75) Chandler MP, Kerner J, Huang H, Vazquez E, Reszko A, Martini WZ, et al. Moderate severity heart failure does not involve a downregulation of myocardial fatty acid oxidation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H1538-43.

76) Evans RD, Hauton D. The role of triacylglycerol in cardiac energy provision. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1860:1481-91

77) Kolwicz SC Jr, Purohit S, Tian R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res.* 2013;113:603-616.

78) Weill L, Belloc E, Bava FA, Méndez R. Translational control by changes in poly(A) tail length: recycling mRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19:577-85.

79) Finck BN. The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease. *Cardiovasc Res.* 2007;73:269-77.

80) Huss J.M., Levy F.H., Kelly D.P. Hypoxia inhibits the peroxisome proliferator-activated receptor alpha/retinoid X receptor gene regulatory pathway in cardiac myocytes: a mechanism for O₂-dependent modulation of mitochondrial fatty acid oxidation. *J Biol Chem.* 2001;276:27605–27612.

81) Razeghi P., Essop M.F., Huss J.M., Abbasi S., Manga N., Taegtmeyer H. Hypoxia-induced switches of myosin heavy chain isogene expression in rat heart.

Biochem Biophys Res Commun. 2003;303:1024–1027.

82) Dewald O., Sharma S., Adroque J., Salazar R., Duerr G.D., Crapo J.D., et al. Downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha gene expression in a mouse model of ischemic cardiomyopathy is dependent on reactive oxygen species and prevents lipotoxicity. *Circulation.* 2005;112:407–415.

83) Remondino A., Rosenblatt-Velin N., Montessuit C., Tardy I., Papageorgiou I., Dorsaz P.A., et al. Altered expression of proteins of metabolic regulation during remodeling of the left ventricle after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:2025–2034.

84) Tomasi, LC. Influência do aumento energético proveniente de dieta hiperlipídica na disfunção cardíaca em ratos com estenose aórtica supravalvar: participação das cadeias pesadas de miosina e da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2013.