UNESP – Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu
Departamento de Clínica Médica - Laboratório de Músculo Isolado

INFLUÊNCIA DA DIETA HIPERLIPÍDICA RICA EM ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS SOBRE O METABOLISMO, ESTRUTURA E FUNÇÃO CARDÍACA DE RATOS COM ESTENOSE AÓRTICA SUPRAVALVAR

Dijon Henrique Salomé de Campos

BOTUCATU

2014

Dijon Henrique Salomé de Campos

INFLUÊNCIA DA DIETA HIPERLIPÍDICA RICA EM ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS SOBRE O METABOLISMO, ESTRUTURA E FUNÇÃO CARDÍACA DE RATOS COM ESTENOSE AÓRTICA SUPRAVALVAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação "Fisiopatologia em Clínica Médica", Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, para a obtenção de título de Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica – Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna

BOTUCATU
2014

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

Campos, Dijon Henrique Salomé de.
Influência da dieta hiperlipídica ricas em ácidos graxos saturados sobre o metabolismo, estrutura e função cardíaca de ratos com estenose aórtica supravalvar / Dijon Henrique Salomé de Campos. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Antonio Carlos Cicogna
Capes: 40101100

1. Coração - Doenças. 2. Artérias coronárias - Estenose. 3. Válvula aórtica - Doenças. 4. Estenose aórtica supravalvular. 5. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Dieta hiperlipídica saturada; Ecocardiograma; Estenose aórtica supravalvar; Função e metabolismo cardíaco; Músculo papilar isolado.

DEDICO

À memória da minha avó Maria, que foi mais que uma mãe, que me transmitiu a sabedoria necessária para viver, a minha eterna saudade e gratidão.

A minha mãe Janete, por me trazer a vida e compartilhar de todos os momentos da minha existência e a minha tia Sueli, companheira de todos os momentos tristes ou alegres, transmitindo-me calma e paciência frente às situações surgidas durante a realização deste trabalho, fazendo com que esses momentos fossem simples. Vocês são conjuntamente merecedoras das minhas conquistas e serei devedor de eterna gratidão.

Apenas se ama, na tranquilidade de nada exigir em troca.

Caio Fernando Abreu

AGRADEÇO

A Deus, pela minha existência.

Ao Professor Dr. Antônio Carlos Cicogna, pela sábia orientação, ensino e cobranças de compromisso ético, moral e profissional! Ao senhor, devo eterna gratidão.

Aos Professores Dra. Maeli Dal Pai e Dr. Katashi Okoshi pelas importantes sugestões no exame geral de qualificação de tese.

Aos Professores Dra. Marina Politi Okoshi e Dr. Katashi Okoshi pela amizade e colaboração profissional.

Ao Professor Dr. Carlos Roberto Padovani pela pronta colaboração nas inúmeras etapas de desenvolvimento e nas análises estatísticas deste trabalho.

Em especial, ao Professor Dr. Katashi Okoshi pela imediata disponibilidade para todos os assuntos e inestimável colaboração nas maratonas ecocardiográficas realizadas neste estudo.

À Profª. Dra. Ana Angélica H. Fernandes, pela realização das análises do metabolismo energético.

Ao José Carlos Benites, proprietário da empresa Biotron Zootécnica – Rio Claro/SP, pelo importante auxílio na formulação e pela doação dos ingredientes utilizados nas dietas desta pesquisa.

"O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar de novo com mais inteligência"

Henry Ford

Ao Celso S. Sant´Anna da empresa Buriti/SP, pelo fornecimento do óleo palmístico, e ao Caio C. Oliveira da empresa Sina indústria de óleos vegetais/SP, pelo fornecimento da casca de soja, ingredientes utilizados nas dietas desta pesquisa.

Aos meus companheiros e amigos nesta jornada: Ricardo, Aline Lima, Marcelo, Mariana, Camila R, Camila B, Luana, Maria Teresa, Sandro, Fabiane, Miriane, Fernanda, Andréia, Beatriz, Bruna, Priscila e Regiane que compartilharam das mesmas dificuldades, expectativas e conquistas.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório: Caroline Mazeto, Izabele, Scarlet, Caroline A, Danielle T, Paula Grippa, Danielle V, Adriana, Carlos, Paula Freire, Damiana e Camila Camacho pela amizade e parceria nos trabalhos.

Aos amigos: Ana Paula, André Leopoldo, André Nascimento, Paula Martinez e Silvio Oliveira-JR, sem os seus ensinamentos e amizade não seria possível à realização deste trabalho, fiquem com o meu eterno respeito e gratidão.

Em especial a Loreta Tomasi por toda a ajuda e companheirismo durante toda a realização deste projeto, vivenciamos acertos e fracassos, alegrias e tristezas, mas o resultado final foi o sucesso obtido, principalmente, pela construção de uma amizade.

A Sandra Ângelo Fábio (Sandrinha) que além de ter sido precisa nos ensinamentos em análises bioquímicas é uma grande amiga, fazendo que os momentos vividos no laboratório fossem extremamente prazerosos.

"Cada um tem de mim exatamente o que cativou"

Charlie Chaplin

A todos os funcionários do Departamento de Clínica Médica: Ana Mengue, Alexandre, Renato, Elisangela, Laura, Mário e Bruno pela colaboração e disponibilidade em todo auxílio requisitado.

A todos os funcionários da Secretaria de Pós-Graduação: Regina, Nathanael, Diego, Márcia, Janete, Andréa e Lílian pela simpatia e solícita disponibilidade em todos os momentos.

A todos os funcionários do Laboratório Experimental: José Carlos, Mário Bruno, Corina, Diego, Eduardo, Elizete, Marcelle, Renata, De Lalla, Elenize, José Aparecido, Ângelo, Rogério, Sueli Clara, Sandra Fábio, Sueli Garcia, Marta e Florian pela colaboração e disponibilidade no que foi necessário.

Aos funcionários da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMB: Alberto (Beto) e Kleber pelo apoio constante quando solicitado.

A CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro, viabilizando o desenvolvimento deste trabalho.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, que por algum motivo não estão citadas acima, devo minha gratidão!

"A maior tragédia da vida é que ficamos velhos, cedo demais. E sábios, tarde demais."

Benjamim Franklin

EPÍGRAFE

"O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário."

(Albert Einstein)

RESUMO

Após uma agressão, o coração remodela-se para manter estável a sua função; entretanto, a remodelação cardíaca (RC) é tempo dependente e a longo prazo pode ser prejudicial. A estenose aórtica supravalvar (EAo) tem sido utilizado para promover o desenvolvimento gradual de hipertrofia ventricular esquerda. Constatou-se que ratos desenvolvem hipertrofia ventricular esquerda, disfunção diastólica e melhoria da função sistólica após 2 e 6 semanas de EAo, manutenção da disfunção diastólica e deterioração do desempenho sistólico na 12ª semana e, na 18ª semana há acentuação da disfunção sistólica e aparecimento de insuficiência cardíaca. Diferentes fatores poderiam contribuir para a disfunção no modelo experimental de EAo como o déficit de oxigênio ou de substrato energético. Em condições aeróbicas normais, aproximadamente 70% da produção de energia miocárdica deriva do metabolismo de ácidos graxos, sendo a contribuição glicolítica em torno de 30%. Estudos mostram que o fator responsável pela escolha do substrato energético cardíaco são os níveis plasmáticos elevados de ácidos graxos e triglicérides. Estudos utilizando modelos experimentais de insuficiência cardíaca constataram que o aumento na oferta de energia por lipídeos, não alteraram ou promoveram melhoria da RC. O objetivo deste trabalho foi testar a hipótese que a maior disponibilidade de energia proveniente dos lipídeos ricos em ácidos graxos saturados restaura o equilíbrio energético miocárdico, atenuando o processo de remodelação patológica (RP). Com a finalidade de testar esta hipótese, foram avaliadas a estrutura, a função e o metabolismo miocárdico de ratos com EAo, tratados com dieta hiperlipídica saturada. Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com 21 dias de idade, separados em grupo controle (Sham) e estenose aórtica supravalvar (EAo); após 6 semanas da cirurgia, os ratos foram redistribuídos em mais dois grupos: tratados com dieta normolipídica ou hiperlipídica saturada (EAo-Normo, n=12; Sham-Normo, n=14; EAo-Hiper, n=14 e Sham-Hiper, n=14). O perfil nutricional foi determinado. A RC foi caracterizada por estudo do metabolismo energético, estrutura e função por ecocardiograma, macroscopia e função miocárdica por músculo isolado. As comparações na 6ª semana foram realizadas pelo teste "*t*" de Student ou Mann-Whitney e, na 18ª semana pela ANOVA complementada com Bonferroni ou Dunn. O nível de significância foi de 5%. Na 6ª semana os animais do grupo EAo apresentaram hipertrofia, disfunção diastólica ventricular, evidenciada pelo aumento

do átrio esquerdo (AE), e melhoria na função sistólica. Na 18ª semana, o perfil nutricional mostrou-se alterado; a ingestão alimentar foi menor nos grupos tratados com dieta hiperlipídica; a gordura corporal total, o índice de adiposidade e a glicemia foram maiores no grupo Sham-Hiper em relação ao Sham-Normo e EAo-Hiper. O metabolismo energético cardíaco apresentou diferença na enzima piruvato desidrogenase por: diminuição do Sham-Hiper vs Sham-Normo, aumento no EAo-Hiper em relação ao EAo-Normo e diminuição no EAo-Normo comparado ao Sham-Normo. O peso do ventrículo esquerdo (VE), dos átrios e do coração e as suas relações com o comprimento da tíbia, foram maiores nos grupos EAo em relação aos Sham. NA 18ª semana os dados ecocardiográficos mostraram que os animais EAo apresentaram espessura relativa do VE, diâmetro absoluto do AE e suas relações com o diâmetro da aorta (AE/AO) e com o peso corporal (AE/PC), aumentados em comparação aos seus respectivos grupos controles. O grupo EAo-Hiper evidenciou velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP) diminuída e relação onda E por onda A (E/A) aumentada em relação ao grupo Sham-Hiper. Em conclusão, a hipótese não foi confirmada. A ração hiperlipídica saturada não atenuou a hipertrofia ventricular e não alterou a função cardíaca. Provavelmente, o resultado foi devido ao fato que os ratos com EAo, não apresentaram uma remodelação de magnitude suficiente para alterar o metabolismo energético e a função do coração.

Palavras-chave: dieta hiperlipídica saturada, função e metabolismo cardíaco, ecocardiograma, músculo papilar isolado, estenose aórtica supravalvar, rato**.**

ABSTRACT

After an aggression, the heart undergoes remodeling to maintain its function stable; however, cardiac remodeling (CR) is time dependent and, in long term, may be harmful. The supravalvular aortic stenosis (AS) has been used to promote gradual development of left ventricular hypertrophy. It was observed that rats develop left ventricular hypertrophy, diastolic dysfunction and improved systolic function after 2 and 6 weeks of AS. After 12 weeks, diastolic dysfunction is maintained and systolic performance deteriorates; around the 18th week, systolic dysfunction is accentuated and signs of heart failure appear. Different factors could contribute to the dysfunction in the experimental model of AS, such as oxygen or energy substrate deficit. Under normal aerobic conditions, approximately 70% of myocardial energy production comes from fatty acid metabolism, and glycolysis contribution is around 30%. Studies have showed that the responsible factor for the choice of cardiac energy substrate is the elevated plasma levels of fatty acids and triglycerides. Studies that used experimental models of heart failure found that the increase in energy supply by lipids did not change or improved RC. The aim of this study was to test the hypothesis that the increased energy availability derived from lipids rich in saturated fatty acids restores myocardial energy balance, attenuating the pathological remodeling process. In order to test this hypothesis, we have evaluated the myocardial structure, function and metabolism of rats with AS fed with saturated high-fat diet. Male Wistar rats, 21 days old, were distributed into control group (Sham) or supravalvular aortic stenosis (AS); 6 weeks after surgery, rats were redistributed into two groups: fed with saturated high-fat diet or normolipidic diet (AS-N, n=12; Sham-N, n=14; AS-H, n=14 and Sham-H, n=14). The nutritional profile was determined. RC was characterized by the study of energy metabolism, macroscopy, structure and function by echocardiography and myocardial function by isolated muscle. Comparisons were performed at 6 weeks by Student's t test or Mann-Whitney test, and at 18 weeks by ANOVA complemented with Bonferroni or Dunn. The level of significance was 5%. In the 6th week, AS group animals presented cardiac hypertrophy, ventricular diastolic dysfunction, evidenced by enlarged left atrium (LA), and improved systolic function. In the 18th week, the nutritional profile was altered; food intake was lower in the groups treated with high-fat diet; total body fat, adiposity index and blood glucose were higher in Sham-H group compared to Sham-N and AS-H. Cardiac energy

metabolism showed different activity of pyruvate dehydrogenase evidenced by a reduction in Sham-H vs. Sham-N, an increase in AS-H compared to AS-N and a decrease in AS-N compared to Sham-N. Left ventricle (LV), atria and total heart weigh, and its relationship with the tibia length, were higher in AS groups compared to Sham. In the 18th week, echocardiographic findings showed that AS animals presented increased LV relative wall thickness, LA diameter and its relations with the aortic diameter (LA/AO) and with the body weight (LA/BW) in comparison to their respective control groups. AS-H group showed decreased posterior wall shortening velocity (PWSV) and increased E/A ratio compared to Sham-H group. In conclusion, the hypothesis was not confirmed. The saturated high-fat diet did not attenuate ventricular hypertrophy and did not alter cardiac function. Probably, the result was due to the fact that the rats with AS did not present a cardiac remodeling of sufficient magnitude to alter energy metabolism and heart function.

Keywords: saturated high-fat diet, cardiac function and metabolism, echocardiography, isolated papillary muscle, supravalvular aortic stenosis, rat.

Lista de quadros

Quadro 1. Composição de macro e micronutrientes e calorias das rações..... 25
Quadro 2. Perfil de ácidos graxos (%)..... 26

Lista de tabelas

Tabela 1. Dados ecocardiográficos dos grupos Sham e EAo..... 40
Tabela 2. Dados ecocardiográficos dos grupos EAo..... 41
Tabela 3. Perfil nutricional dos animais..... 43
Tabela 4. Porcentagem (%) de umidade nos tecidos..... 44
Tabela 5. Metabolismo energético cardíaco..... 45
Tabela 6. Análise macroscópica cardíaca *post mortem* 46
Tabela 7. Análise estrutural e funcional ecocardiográfica 48
Tabela 8. Função miocárdica basal 49
Tabela 9. Efeito da potenciação pós-pausa (PPP) na tensão desenvolvida..... 51
Tabela 10. Efeito da potenciação pós-pausa (PPP) na tensão de repouso..... 51
Tabela 11. Efeito da potenciação pós-pausa (PPP) na velocidade de elevação da tensão desenvolvida..... 52
Tabela 12. Efeito da potenciação pós-pausa (PPP) na velocidade de decréscimo da tensão desenvolvida..... 52
Tabela 13. Efeito da elevação da concentração de cálcio extracelular (Ca^{2+}) na tensão desenvolvida..... 54
Tabela 14. Efeito da elevação da concentração de cálcio extracelular (Ca^{2+}) na tensão de repouso..... 54
Tabela 15. Efeito da elevação da concentração de cálcio extracelular (Ca^{2+}) na velocidade de elevação da tensão desenvolvida..... 55
Tabela 16. Efeito da elevação da concentração de cálcio extracelular (Ca^{2+}) na velocidade de decréscimo da tensão desenvolvida..... 55
Tabela 17. Efeito da elevação da frequência cardíaca (FC) na tensão desenvolvida.. 57
Tabela 18. Efeito da elevação da frequência cardíaca (FC) na tensão de repouso..... 57
Tabela 19. Efeito da elevação da frequência cardíaca (FC) na velocidade de elevação da tensão desenvolvida..... 58
Tabela 20. Efeito da elevação da frequência cardíaca (FC) na velocidade de decréscimo da tensão desenvolvida..... 58
Tabela 21. Efeito do isoproterenol (ISO) na tensão desenvolvida..... 60
Tabela 22. Efeito do isoproterenol (ISO) na tensão de repouso,,,,..... 60
Tabela 23. Efeito do isoproterenol (ISO) na velocidade de elevação da tensão desenvolvida..... 61
Tabela 24. Efeito do isoproterenol (ISO) na velocidade de decréscimo da tensão desenvolvida..... 61

Lista de figuras

Figura 1. Delineamento experimental..... 24
Figura 2. Representação esquemática da curva de contração isométrica..... 35

SUMÁRIO

Lista de quadros

Lista de tabelas

Lista de figuras

RESUMO

1. INTRODUÇÃO..... 17

2. MATERIAL E MÉTODOS..... 23

2.1- Animais..... 23

2.2- Protocolo experimental..... 23

2.3- Composição das rações normo e hiperlipídica..... 24

2.4- Indução de estenose aórtica supravalvar..... 27

2.5- Análise do perfil nutricional..... 27

2.6- Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático..... 28

2.7- Caracterização da remodelação cardíaca..... 29

2.7.1- Análise estrutural e funcional do coração por ecocardiograma..... 29

2.7.2- Análise macroscópica do coração..... 30

2.7.3- Análise do metabolismo energético miocárdico..... 31

2.7.3.1- Obtenção das amostras..... 31

2.7.3.2- Quantificação das enzimas reguladoras..... 31

2.7.4- Análise da função miocárdica dos músculos Papilares Isolados..... 32

2.7.4.1- Parâmetros funcionais..... 35

2.7.4.2- Protocolo funcional..... 36

2.7.4.2.1- Protocolo funcional em condição basal..... 36

2.7.4.2.2- Manobras inotrópicas e lusitrópicas..... 36

2.7.4.2.2.1- Potenciação pós-pausa..... 36

2.7.4.2.2.2- Elevação da concentração de cálcio extracelular..... 37

2.7.4.2.2.3- Alteração da frequência cardíaca..... 37

2.7.4.2.2.4- Estímulo da via beta-adrenérgica..... 37

2.8- Análise estatística..... 38

3. RESULTADOS..... 40

3.1- Avaliação dos animais na sexta semana..... 40

3.1.1- Caracterização ecocardiográfica dos grupos Sham e EAo..... 40

3.2- Avaliação dos animais na décima oitava semana..... 42

3.2.1- Perfil nutricional..... 42
3.2.2- Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático..... 44
3.2.3- Caracterização da remodelação cardíaca..... 45
3.2.3.1- Enzimas reguladoras do metabolismo energético cardíaco..... 45
3.2.3.2- Macroscopia do coração..... 45
3.2.3.3- Estrutura e função do coração por ecocardiograma..... 47
3.2.3.4- Função miocárdica dos músculos papilares isolados..... 49
3.2.3.4.1- Condição basal..... 49
3.2.3.4.2- Potenciação pós-pausa..... 50
3.2.3.4.3- Elevação da concentração extracelular de cálcio..... 53
3.2.3.4.4- Alteração da frequência cardíaca..... 56
3.2.3.4.5- Estímulo da via beta-adrenérgica..... 59
4. DISCUSSÃO..... 62
4.1- Dietas hiperlipídicas..... 62
4.2- Estrutura e função por ecocardiograma na 6ª semana..... 63
4.3- Perfil nutricional dos animais na 18ª semana..... 64
4.4- Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático..... 65
4.5- Remodelação cardíaca na 18ª semana..... 65
4.5.1- Metabolismo energético miocárdico..... 65
4.5.2- Macroscopia cardíaca..... 66
4.5.3- Estrutura e função por ecocardiograma..... 67
4.5.4- Função miocárdica dos músculos papilares isolados..... 68
5. CONCLUSÃO..... 70
6. REFERÊNCIAS..... 71

1. INTRODUÇÃO

O termo remodelação cardíaca (RC) ou remodelamento é amplamente utilizado na literatura e pode ser definido como alterações na expressão gênica, moleculares, celulares ou intersticiais que podem manifestar-se clinicamente por alterações de tamanho, da geometria, da massa, do volume e da função do coração, em resposta a uma determinada agressão [1,2].

A RC é um fenômeno que faz parte do desenvolvimento natural do coração até a vida adulta [3], entretanto, este termo é empregado para descrever fenômenos ocorridos em situações não fisiológicas, tais como isquemia, inflamação, alterações genéticas, sobrecargas de volume ou de pressão [1,2]. Após uma agressão, o coração passa, inicialmente, por um período de adaptação, no qual se remodela buscando manter estável a sua função, sendo este um importante mecanismo adaptativo [4,5]. Entretanto, o processo de RC é tempo dependente; a longo prazo pode ser prejudicial, constituindo um importante fator de risco para o desenvolvimento da disfunção ventricular e para o quadro de insuficiência cardíaca [5-7].

Diversos modelos experimentais têm sido propostos para o estudo da RC por sobrecarga pressórica. Entre eles, destacam-se a indução de estenose de artéria renal [8] e de aorta abdominal [9-11] ou torácica [2,12-17], ou mesmo o desenvolvimento de animais geneticamente modificados, como o rato espontaneamente hipertenso [18]. No entanto, muitos desses modelos animais apresentam limitações para seu uso em trabalhos experimentais; por exemplo, a indução de estenose de artéria renal ou de aorta abdominal, em ratos, além de acarretar hipertensão arterial sistêmica e hipertrofia ventricular esquerda, pode estimular o sistema renina-angiotensina-aldosterona [19,20]. A intensa ativação neurohormonal está associada à ocorrência de

importantes lesões cardíacas, como necrose miocárdica, peri-arterite e fibrose reparativa [8,11]. Desta maneira, estes modelos podem ser muito agressivos ao miocárdio e, portanto, pouco representativos de lesões que se desenvolvem, gradualmente, em humanos com sobrecarga pressórica crônica. Por outro lado, os ratos espontaneamente hipertensos desenvolvem aumento gradual da pressão arterial sistêmica a partir de um mês de idade e aos três meses apresentam estabelecida hipertrofia ventricular esquerda [18]; esses ratos exibem longo período de hipertrofia miocárdica estável sem desenvolver insuficiência cardíaca, que ocorre, em geral, somente a partir de 20 meses de idade [18,21,22]. Portanto, embora nesse modelo as alterações sejam semelhantes às que ocorrem na cardiopatia hipertensiva humana [21], há um custo muito elevado para os estudos de prevenção e tratamento de insuficiência cardíaca, porque os animais têm que ser mantidos em biotério por longo período de tempo.

Recentemente, a estenose aórtica supravalvar (EAo) tem sido utilizado para promover o desenvolvimento gradual de hipertrofia ventricular esquerda em ratos jovens [2,12-17,23,24]. A sobrecarga pressórica inicialmente é leve, acentuando-se progressivamente à medida que os animais crescem, assemelhando-se, parcialmente à estenose aórtica no homem [13]. As vantagens deste modelo experimental são a ausência de severas lesões anatômicas no miocárdio e baixo custo para manutenção dos animais, devido ao curto período necessário para o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda e insuficiência cardíaca.

Em nosso laboratório, têm sido realizados experimentos com EAo em ratos, com a finalidade de se avaliar aspectos morfofuncionais do coração em diferentes períodos do processo de RC, inclusive no momento da constatação de sinais clínicos de insuficiência cardíaca [2,13-17]. Constatou-se, por estudo ecocardiográfico,

que ratos desenvolvem hipertrofia ventricular esquerda [25], disfunção diastólica e melhoria da função sistólica após 2 e 6 semanas da indução da EAo [2]. Esses estudos mostraram manutenção da disfunção diastólica e deterioração do desempenho sistólico a partir da 12ª semana; após a 18ª semana há acentuação da disfunção sistólica e aparecimento de sinais de insuficiência cardíaca ao redor da 20ª semana [15-17]. Trabalhos que avaliaram a função miocárdica utilizando músculos papilares isolados do ventrículo esquerdo (VE) nesse modelo experimental são escassos. Em nosso laboratório, Okoshi et al (2004) não encontraram disfunção miocárdica após 8 semanas de EAo [26]; Bregagnollo et al (2006 e 2007) avaliando animais com EAo por longo período, 21 semanas, verificaram disfunção mecânica miocárdica diastólica e sistólica [16,17].

Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela depressão da função cardíaca não estão totalmente esclarecidos. Diferentes fatores poderiam contribuir para a disfunção no modelo experimental de EAo: alteração no trânsito de cálcio, nas proteínas contráteis, na matriz extracelular, na modulação autonômica, necrose ou apoptose dos miócitos e déficit de oxigênio ou de substrato energético [1,5,27,28].

O coração é um órgão cujas células estão adaptadas para contrações ininterruptas e altamente coordenadas. Para exercer sua função necessita de constante suprimento de substratos metabólicos de alto teor energético. O coração é capaz de utilizar uma variedade de substratos e de se adaptar rapidamente às alterações da oferta do tipo do suprimento energético [29]. Os principais nutrientes utilizados pelo coração são os ácidos graxos e a glicose. Em condições aeróbicas normais, aproximadamente 70% da produção de energia miocárdica deriva do metabolismo de ácidos graxos, sendo a contribuição glicolítica em torno de 30% [30-34]. O miocárdio não sintetiza ácidos graxos, sendo que a utilização deste substrato

depende fundamentalmente de suprimentos exógenos. As fontes para o coração incluem os ácidos graxos livres do plasma e os liberados pela hidrólise das lipoproteínas plasmáticas ricas em triglicerídeos [35,36]. A glicose utilizada pelo miocárdio é derivada do plasma ou de estoques intracelulares de glicogênio [37]. A glicose é o principal substrato para o metabolismo oxidativo do coração quando os níveis plasmáticos de ácidos graxos são baixos e as concentrações de glicose e de insulina são altas, como no estado pós-prandial [36]. Há uma relação inversa entre a concentração de ácidos graxos plasmáticos e a oxidação de glicose pelo tecido miocárdico [38]. Estudos clínicos [39,40] e experimentais [33,37,38] têm mostrado que o fator responsável pela escolha do substrato energético cardíaco são os níveis plasmáticos elevados de ácidos graxos e triglicérides [38,41,42]. O aumento dos níveis de ácidos graxos inibe a ação da enzima piruvato desidrogenase na mitocôndria, impedindo a conversão do piruvato em acetil-coA [38,43]. A inibição do metabolismo da glicose pela oxidação dos ácidos graxos foi observada pela primeira vez no coração isolado [44] e, também, ocorre no coração *in vivo* [37,39].

Embora a glicose não seja o principal substrato metabólico em condições fisiológicas normais, ela assume grande importância em condições patológicas como no processo de remodelação e de insuficiência cardíaca. Nestas situações, ocorrem adaptações metabólicas como aumento da utilização de glicose por elevação na atividade das enzimas glicolíticas, e diminuição do consumo de ácidos graxos por alteração no sistema de beta oxidação mitocondrial [45]; a principal razão para este desvio metabólico é a economia relativa no consumo de oxigênio. Embora os ácidos graxos produzam maior número de adenosina trifosfato (ATP) com a beta oxidação (130 ATP) em relação a glicose (38 ATP), a utilização deste substrato é associada a maior eficiência energética (3,17 ATP/O_2), quando comparada aos ácidos graxos

(2,83 ATP/O_2) [46]. Essa alteração metabólica pode resultar em déficit energético em razão da quantidade de energia produzida pelos carboidratos ser menor que o dos ácidos graxos [30,38].

Embora a deficiência energética contribua para a ocorrência da disfunção do coração [47], os estudos que utilizaram modelos experimentais de insuficiência cardíaca constataram que o aumento na oferta de energia por suplementação com ácidos graxos insaturados/saturados não alteraram [48-52] ou promoveram melhoria [53-57] da RC. Em ratos com infarto do miocárdio, por oclusão coronária, por um período de 5 a 8 semanas, a disfunção cardíaca manteve-se inalterada com uma dieta rica em ácidos graxos saturados, embora promovesse melhora da função mitocondrial [49,52]. Em camundongos com EAo tratados com dieta rica em ácidos graxos saturados, por 16 semanas, não houve exacerbação da hipertrofia cardíaca e da fração de ejeção do VE [48]. No modelo experimental de hipertensão arterial, por ratos sensíveis ao sal, à administração de dieta com alto nível de ácidos graxos saturados preveniu a resposta hipertrófica e a disfunção cardíaca do VE [53].

Trabalhos que avaliaram a influência da administração de ácidos graxos insaturados no modelo de estenose da aorta abdominal, por 9 semanas, constataram que a dieta hiperlipídica atenuou o remodelamento e a queda do desempenho do VE [54,55]. Nos trabalhos que constataram melhoria da função e atenuação da hipertrofia, os autores não associaram essas mudanças à restauração do metabolismo energético miocárdico. Chess e Stanley (2008) revisando o papel dos substratos energéticos sobre o desenvolvimento e progressão da falência cardíaca, sugerem que esta síndrome pode ser prevenida ou retardada por dieta pobre em níveis glicêmicos e rica em ácidos graxos [47].

Em razão de não ter sido encontrado estudos que avaliaram a influência do restabelecimento energético, por ácidos graxos, em corações com remodelação patológica, o objetivo deste trabalho é testar a hipótese que a maior disponibilidade de energia proveniente dos ácidos graxos saturados restaura o equilíbrio energético miocárdico, atenuando o processo de remodelação patológica (RP). Se o pressuposto for verdadeiro, a maior oferta de ATP para o miocárdio atenua a hipertrofia, retardando o aparecimento da disfunção sistólica e ameniza a disfunção diastólica ventricular esquerda em ratos com sobrecarga pressórica. Com a finalidade de testar a hipótese, foram avaliadas a estrutura, a função e o metabolismo miocárdico de ratos com estenose aórtica supravalvar, apresentando hipertrofia e disfunção diastólica do ventrículo esquerdo e, tratados com dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados.

A importância deste trabalho está no fato que, desde que o déficit energético é considerado um fator fundamental na deterioração da função do músculo cardíaco hipertrofiado [47], o aumento da oferta de energia por um método terapêutico de baixo custo e fácil execução poderá corroborar na manutenção da sobrevida dos pacientes com cardiopatias graves, até a utilização de uma terapia definitiva.

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 ± 2°C), umidade controlada (55 ± 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 em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP".

2.2 – Protocolo experimental

Inicialmente, foram formados dois grupos experimentais: controle operado (Sham) e estenose aórtica supravalvar (EAo), tratados com dieta normolipídica. 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 normo ou hiperlipídica rica em ácidos graxos saturados (EAo-Normo, n=12; Sham-Normo, n=14; EAo-Hiper, n=14 e Sham-Hiper, n=14) (Figura 1). As dietas hiperlipídicas foram administradas após a 6ª semana de EAo, em virtude de trabalhos anteriores mostrarem que esses animais apresentam hipertrofia ventricular esquerda, disfunção diastólica e melhoria da função sistólica do VE [2,17,25].

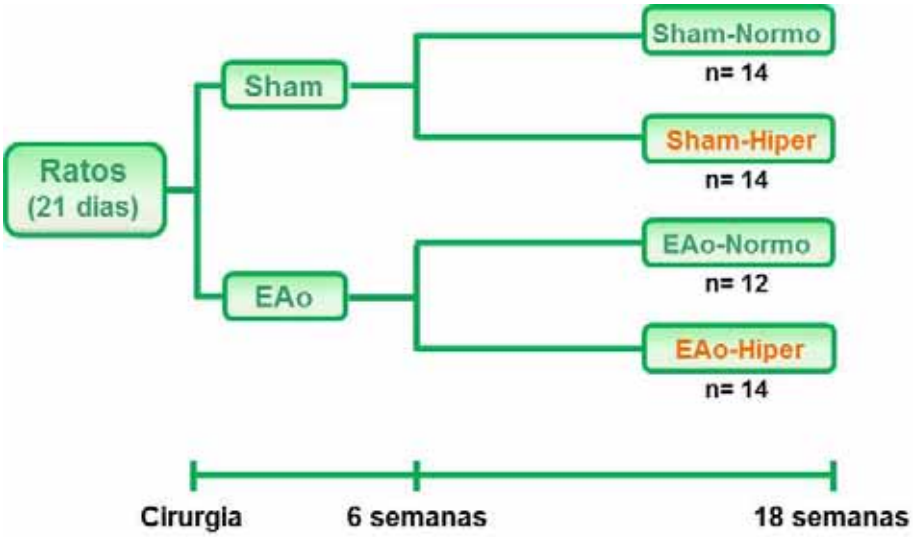

Figura 1. Delineamento experimental

Os animais de todos os grupos foram avaliados 12 semanas após o início da administração das dietas normolipídica e hiperlipídica, ou seja, 18 semanas após o procedimento cirúrgico. Nesse 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 20ª semana [2,25,58]. Foram excluídos do protocolo experimental os animais que apresentaram sinais de insuficiência cardíaca como, taquipneia associada a um dos seguintes sinais: edema, ascite, derrame pleuro-pericárdico, trombo em átrio esquerdo e retenção hídrica nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático [18].

2.3 – Composição das rações normo e hiperlipídica

Na composição das rações foram utilizados os seguintes ingredientes: farelo e casca de soja, milho, dextrina, óleo de soja e palmístico e premix vitamínico e mineral. As quantidades foram adicionadas a fim de produzir duas dietas distintas em quantidade e teor de lipídeos, ou seja, normo e hiperlipídicas ricas em ácidos

graxos saturados, porém com a mesma quantidade de carboidratos. Os níveis de garantia foram obtidos por dosagem bromatológica dos componentes das dietas. As rações foram idealizadas no Laboratório Experimental de Músculo Papilar Isolado do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, e manipuladas em parceria com a empresa Biotron Zootécnica®, Rio Claro, São Paulo, Brasil. A composição de macro e micronutrientes das rações normo e hiperlipídica e as suas calorias estão apresentadas no Quadro 1 e, o perfil dos ácidos graxos no Quadro 2. O modelo dietético foi uma adaptação de trabalhos anteriores publicados por nosso grupo [59,60].

Quadro 1. Composição de macro e micronutrientes e calorias das rações

Componentes	**Rações**	
	Normolipídica	**Hiperlipídica**
Proteína (%)	24	18
Carboidrato (%)	40	40
Gordura (%)	6	17
Fibras (%)	12	9
Outros* (%)	18	16
Calorias (Kcal/g)	**2,93**	**3,64**

* Outros: umidade, vitaminas e minerais.

Quadro 2- Perfil de ácidos graxos (%)

	Rações	
Ácidos graxos	**Normolipídica**	**Hiperlipídica**
Capróico (c6:0)	0,11	0,13
Caprílico (c8:0)	1,99	2,18
Cáprico (c10:0)	2,12	2,32
Undecanoico (c11:0)	0,02	0,02
Láurico (c12:0)	30,81	33,73
Tridecanoico (c13:0)	0,04	0,04
Mirístico (c14:0)	11,06	12,10
Pentadecanoico (c15:0)	0,01	0,00
Palmítico (c16:0)	11,95	11,18
Heptadecanóico (c17:0)	0,04	0,02
Esteárico (c18:0)	2,89	2,66
Araquídico (c20:0)	0,24	0,22
Behênico (c22:0)	0,12	0,12
Tricosanóico (c13:0)	0,02	0,01
Lignocérico (c24:0)	0,08	0,07
Palmitoléico (c16:1)	0,04	0,02
Heptadecenoico17:1)	0,02	0,01
Oléico (c18:1n9c)	19,48	20,71
Cis-vacênico (c18:1n7)	0,49	0,33
Linoléico (c18:2n6c)	16,69	12,95
α-Linolênico (c18:3n3)	1,67	1,05
Eicosanoico (c20:1n9)	0,10	0,11
Ácidos Graxos Saturados	**61,52**	**64,81**
Ácidos Graxos Insaturados	**38,48**	**35,19**

2.4 – Indução de estenose aórtica supravalvar

A EAo foi induzida de acordo com o método previamente descrito em nosso laboratório [2,12-17]. Os animais com três a quatro semanas de vida, pesando de 70 a 90 gramas, após anestesia com cloridrato de ketamina (60 mg/kg) e cloridrato de xilidino (10 mg/kg) intramuscular, foram submetidos à toracotomia mediana, a aorta ascendente foi dissecada e um clipe de prata, com 0,6 mm de diâmetro interno, foi colocado aproximadamente a 3 mm da sua raiz. A parede torácica foi fechada utilizando-se fio *mononylon* 5.0 para suturar o esterno, as camadas musculares e a pele. Durante a cirurgia, os animais foram ventilados manualmente com pressão positiva com oxigênio a 100%. Concluído o ato cirúrgico, os ratos receberam subcutaneamente 1 ml de soro fisiológico aquecido e foram colocados em superfície aquecida até retornarem da anestesia. Os animais do grupo Sham foram submetidos à mesma cirurgia, exceto pela colocação do clipe.

2.5 – Análise do perfil nutricional

O perfil nutricional foi determinado pela análise de ingestão alimentar e 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 retroperitonial dos animais. A partir da soma dos

depósitos normalizada pelo peso corporal [(epididimal+retroperitonial+visceral)/peso corporal x 100] calculou-se o índice de adiposidade, adaptado de Boustany et al (2005) [61]. 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 -80ºC. 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 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, Brazil).

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

Como os animais submetidos a indução da EAo podem desenvolver retenção hídrica, caracterizando sinais de insuficiência cardíaca, a avaliação do teor de água tecidual foi realizada nas amostras de VE, ventrículo direito (VD), átrios (AT), 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 ± 5℃, por período de 48 horas. A determinação do teor de água foi expressa em valores relativos e calculada pela seguinte fórmula: [(PN-PS)/PN] x 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-Normo e EAo-Hiper. O ecocardiograma representa uma alternativa para o estudo da função ventricular e pode oferecer importantes informações sobre desempenho cardíaco em roedores [62]. Ele permite avaliar: 1) a morfologia e a função do coração [16,17,24]; 2) a evolução da disfunção cardíaca causada por diferentes tipos de agressão [63]; e 3) os efeitos de diferentes intervenções sobre o coração [15]. É um método versátil, seguro, indolor, não invasivo e importante para análises seriais [64]. É um processo que causa menos alterações fisiológicas cardíacas do que técnicas invasivas, como a hemodinâmica [65]. É amplamente aceito e utilizado para a determinação da massa do ventrículo esquerdo, embora possa superestimar os valores determinados pós-sacrifício [66].

Para 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 Eletric 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 VE foi obtida posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares [24]. 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 intraventricular (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 intraventricular (ESSIV) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro mínimo da cavidade. Para avaliar a função sistólica do VE, foram calculadas a fração de ejeção [($DDVE^3$ – $DSVE^3$) / $DDVE^3$], a porcentagem de encurtamento endocárdico (% Enc. Endo), [(DDVE - DSVE) / DDVE], a porcentagem de encurtamento mesocárdico, ΔD meso {[(DDVE + ½ EDPP + ½ EDSIV) – (DSVE + ½ ESPP + ½ ESSIV)] / (DDVE + ½ EDPP + ½ 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, consequente 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 [67].

2.7.2 – Análise macroscópica do coração

A análise macroscópica *post mortem* permite identificar a presença de hipertrofia a nível 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 os pesos absolutos do VE, do VD, dos AT e do coração e, as suas relações com o comprimento da tíbia: VE/tíbia, VD/tíbia, AT/tíbia e coração/tíbia.

2.7.3 – Análise do metabolismo energético miocárdico

O metabolismo energético miocárdico foi analisado por meio das enzimas reguladoras envolvidas no metabolismo da glicose e dos ácidos graxos. Foram analisadas as seguintes enzimas: fosfofrutoquinase (PFK, E.C.2.7.1.11) e piruvato desidrogenase (PDH, E.C.1.2.4.1), associadas à via anaeróbica; beta-hidroxi-acil CoA desidrogenase (OHADH, E.C.1.1.1.35), relacionada à oxidação dos ácidos graxos [68].

2.7.3.1 – Obtenção das amostras

Amostras de 200 mg do VE foram homogeneizadas em *Potter Elvehjem* com pistilo de teflon, com 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. Os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4^{o}C, sendo os sobrenadantes utilizados para as determinações de proteínas totais e enzimas reguladoras das vias metabólicas.

2.7.3.2 – Quantificação das enzimas reguladoras

A atividade da PFK foi determinada em solução tampão contendo Tris-HCl (50 mM; pH 8,0), $MgCl_2$, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, aldolase, trifosfato isomerase, ATP e frutose-6-fosfato, com medidas da velocidade de oxidação do $NADH_2$. Na presença de tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 7,4), determinou-se a atividade da PDH em mistura reativa contendo NAD, tiamina pirofosfato, coenzima

A, ditiotreitol, $MgCl_2$, NBT, piruvato de sódio e fenazina metasulfato, onde se mediu a conversão do piruvato em acetil-CoA através da velocidade da redução do NAD. A atividade da OHADH foi determinada na presença de 0,1 mM de NADH, tendo 0,05 mM de acetoacetil coenzima-A como substrato. Os reagentes utilizados foram da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). As atividades enzimáticas foram determinadas com a utilização do leitor de microplacas µQuant MQX200 e software KCjunior (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA), e as análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro UV/visível Ultrospec 5000 e software Swift II (Pharmacia Biotech, Cambridge, ENG, UK).

2.7.4 – Análise da função miocárdica dos músculos papilares isolados

A técnica que utiliza o músculo papilar isolado do VE, realizada rotineiramente em nosso laboratório [22,26,69], avalia a função mecânica do miocárdico *in vitro*. Esta preparação permite detectar alterações precoces na contração e no relaxamento do músculo cardíaco [69], independente das variações da pós-carga, pré-carga, frequência cardíaca, influência hormonal e substrato energético, o que é difícil de ser obtido na avaliação do coração *in vivo*. O estudo funcional do músculo papilar isolado do VE foi realizado conforme técnica descrita abaixo.

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico, 50 mg/kg/ip, eutanasiados por decapitação e submetidos à toracotomia mediana. Os corações foram rapidamente removidos e colocados em solução de Krebs-Henseleit [70] com a seguinte composição em mM: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 2,5 $CaCl_2$; 1,16 $MgSO_4$; 1,18 KH_2PO_4; 5,50 glicose e 24,88 $NaCO_3$, mantidos à temperatura de 28°C, previamente oxigenada durante 10 minutos com 95% de oxigênio (O_2) e 5% de dióxido de carbono (CO_2). Após permanecerem aproximadamente 1 minuto na solução, os

corações foram retirados e o ventrículo direito dissecado com a finalidade de expor o septo interventricular; este foi dividido a fim de permitir a exposição adequada dos dois músculos papilares, anterior e posterior, do VE. Os músculos papilares foram cuidadosamente dissecados, mantendo-se nas suas extremidades segmentos da parede ventricular. Esses fragmentos foram presos a anéis de aço inoxidável com diâmetro interno de 3,8 e 4,2 mm; a fixação dos anéis nestes fragmentos tem como finalidade evitar a lesão da extremidade dos músculos papilares. Estes, após terem suas extremidades presas aos anéis, foram rapidamente transferidos para câmara de vidro contendo a mesma solução de Krebs-Henseleit descrita acima, continuamente oxigenada com 95% de O_2 e 5% de CO_2 e mantida à temperatura de 28°C, graças ao uso de banho circulante (Refrigerating/Heating -20˚C to 150˚C, PolyScience Division of Preston Industries, Inc., Niles, IL, USA). O músculo papilar foi posicionado verticalmente e sua extremidade inferior acoplada a um fio de aço inoxidável, 0,38 mm de diâmetro, conectado a um transdutor de força (Grass FT03 Force Displacement Transducer, GRASS Technologies, An Astro-Med, Inc. Product Group, West Warwick, RI, USA). O fio de aço atravessava uma fenda, preenchida por mercúrio, existente no assoalho da câmara de vidro. A porção superior tendinosa do músculo papilar foi conectada a um fio de aço, semelhante ao anterior, que estava ligado à extremidade do braço longo de uma alavanca isotônica de metal. Sobre esta extremidade existia um micrômetro (L.S. Starrett. Co. Athol. Mass. nº463, USA) que controlava a extensão dos movimentos da alavanca, permitindo ajustar o comprimento de repouso do músculo papilar. Na extremidade do braço curto da alavanca foi suspenso, por fio de aço, semelhante aos anteriores, um peso de 5,0 g, denominado pré-carga, que tinha por finalidade promover o estiramento inicial do

músculo papilar. A alavanca era constituída de alumínio ou bronze, rígida e leve, sendo a razão entre os braços longo e curto de 4:1.

Os músculos papilares foram estimulados 12 vezes por minuto (0,2 Hz) por meio de eletrodos de platina tipo agulha (Grass E8, GRASS Technologies, An Astro-Med, Inc. Product Group, West Warwick, RI, USA), posicionados paralelamente ao eixo longitudinal dos músculos. Os eletrodos foram acoplados a estimulador elétrico (Grass S48, GRASS Technologies, Na Astro-Med, Ic. Product Group, West Warwick, RI, USA) que emitia estímulos em onda quadrada de 5 mili-segundos. A voltagem de estímulo utilizada foi, 12 a 15 volts, aproximadamente 10% acima do valor mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo. O pH da solução foi entre 7,38 e 7,42 e a pressão parcial de oxigênio da solução foi mantida entre 550 e 600 mmHg.

Após período de 60 minutos, durante os quais os músculos contraíram contra a pré-carga sem desenvolverem força, contração isotônica, foi colocado uma carga adicional de 50 g, denominada pós-carga, na extremidade do braço curto da alavanca. A carga total, pré-carga acrescida da pós-carga, impedia que os músculos encurtassem, passando os mesmos a desenvolverem somente força, contração isométrica. O excessivo estiramento muscular que poderia ser causado pela adição da pós-carga foi evitado pelo micrômetro que impedia a movimentação da alavanca. Após a estabilização do músculo em contração isométrica, este foi progressivamente estirado, por meio do micrômetro, até a força desenvolvida atingir o seu valor máximo. O comprimento de estiramento da fibra muscular associado à força ou tensão máxima desenvolvida, em contração isométrica, denominou-se Lmax. Após atingir o Lmax, o músculo foi novamente colocado em contração isotônica durante 5 minutos. A seguir, o músculo papilar foi recolocado em contração isométrica para

determinação final de Lmax. O registro das variáveis foi iniciado após verificar-se que o músculo permaneceu estável em contração isométrica durante 15 minutos.

2.7.4.1- Parâmetros funcionais

Os seguintes parâmetros mecânicos foram analisados a partir de curvas obtidas durante uma contração isométrica: tensão desenvolvida (TD, g/mm^2), tensão de repouso (TR, g/mm^2), velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida (+dT/dt, g/mm^2/s) e velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida (-dT/dt, g/mm^2/s). A Figura 2 ilustra a curva de contração isométrica que foi obtida durante os experimentos.

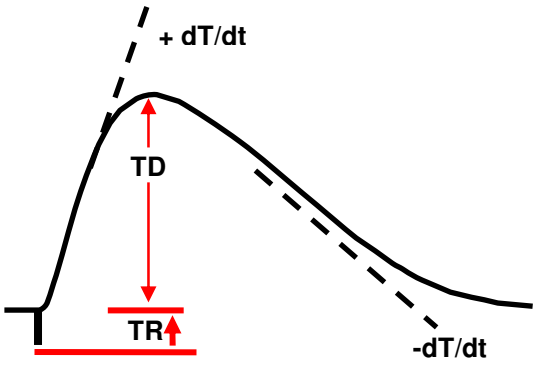

Figura 2. Representação esquemática da curva de contração isométrica

As contrações isométricas foram registradas em um sistema de aquisição de dados computadorizado (AcqKnowledge® MP100, Biopac Systems, Inc, Santa Barbara, CA, USA). A análise das curvas permitiu determinar os valores dos parâmetros mecânicos. Os valores da TD, TR, +dT/dt e –dT/dt foram divididos pela área seccional do músculo papilar. Este processo de normalização permitiu comparar o desempenho de músculos de diferentes tamanhos.

2.7.4.2- Protocolo funcional

O desempenho mecânico dos músculos papilares em contração isométrica foi analisado sob condição basal e após diferentes manobras inotrópicas e lusinotrópicas. Essas foram utilizadas com a finalidade de identificar alterações da contração e do relaxamento que poderiam não ser observadas em condições basais. Além disso, as mesmas podem auxiliar no entendimento dos possíveis mecanismos relacionados com as alterações da função mecânica do miocárdio. As manobras mais frequentemente utilizadas são: potenciação pós-pausa [71], variação da concentração extracelular de cálcio [72] e alteração da frequência [73], que permitem identificar a participação do trânsito de cálcio intracelular na patogênese da disfunção do miocárdio. Foi também realizado o estímulo com isoproterenol, que permite avaliar a via beta-adrenérgica [74].

2.7.4.2.1- Protocolo funcional em condição basal

A obtenção dos dados em condição basal foi realizada com concentração de cálcio de 2,5 mM na solução de Krebs-Henseleit.

2.7.4.2.2- Manobras inotrópicas e lusitrópicas

As seguintes manobras inotrópicas e lusinotrópicas miocárdicas foram realizadas:

2.7.4.2.2.1- Potenciação pós-pausa

A potenciação do potencial pós-pausa (PPP) é um instrumento utilizado para estudar a função de liberação e armazenamento de cálcio pelo retículo sarcoplasmático [71]. Além disso, esta manobra permite analisar indiretamente o

trocador Na^{+}/Ca^{+2}. A relação entre PPP e a função miocárdica foi realizada com concentração de cálcio de 0,5 mM na solução de Krebs-Henseleit e após períodos de repouso de 10, 30 e 60 segundos com intervalos de 5 minutos entre cada intervenção. Os períodos crescentes tiveram como finalidade disponibilizar maiores quantidades de cálcio citosólico e, portanto, intensificar a magnitude do desempenho do músculo cardíaco.

2.7.4.2.2.2- Elevação da concentração de cálcio extracelular

A elevação da concentração de cálcio intracelular acarreta aumento do fluxo desse íon por meio dos canais lentos de Ca^{+2} e pela troca Na^{+}/Ca^{+2} [72], o que permite avaliar os mecanismos relacionados com o transporte de cálcio intracelular e a função miocárdica. A elevação da concentração de cálcio na solução de Krebs-Henselet foi realizada com aumentos sequenciais de Ca^{+2} de 0,5 para 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 e 3,5 mM com intervalos de 5 minutos entre cada adição.

2.7.4.2.2.3- Alteração da frequência cardíaca

A relação entre frequência de batimentos e função cardíaca permite avaliar o trânsito de cálcio intracelular e o complexo acoplamento-excitação-contração [73]. Esta manobra foi realizada com concentração de cálcio de 1,0 mM na solução de Krebs-Henselet. A alteração da frequência de estímulo foi de 0,2 para 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 Hz, com intervalos de 5 minutos entre cada intervenção.

2.7.4.2.2.4- Estímulo da via beta-adrenérgica

O isoproterenol (Sigma®-Aldrich, St Louis, MO, USA) é um agonista beta-adrenérgico [74]. Esta manobra foi realizada com concentração de cálcio de 1,0 mM

na solução de Krebs-Henselet. A dose de isoproterenol diluída em água ultrapura e o tempo de exposição ao estimulador para a realização do experimento foi, respectivamente, 10^{-8}, 10^{-7} e 10^{-6} M com intervalos de 10 minutos entre cada adição.

Após o término das manobras de avaliação mecânica do músculo papilar, os mesmos foram retirados da preparação e usados para a avaliação da área seccional. Os parâmetros morfológicos utilizados para caracterizar os músculos papilares foram: comprimento (mm), peso (mg) e área seccional (mm^2). O comprimento *in vitro*, (Lmax) foi medido com auxílio de um catetômetro Gartner (Gartner Scientific Corporation, Chicago, USA). A porção muscular entre os anéis de aço foi cortada, submetida à secagem com papel filtro e pesada. Considerando-se que o músculo papilar tem forma cilíndrica, uniforme e peso específico aproximadamente unitário, a área seccional foi calculada dividindo-se o peso pelo comprimento determinado em Lmax.

Os músculos papilares dissecados inadequadamente ou que apresentaram comportamento funcional fora do padrão de normalidade foram excluídos do estudo. O desempenho mecânico foi considerado inadequado quando os valores das variáveis obtidas em contração isométrica apresentaram afastamento superior a 1,96 desvios padrão da média. Os músculos papilares que apresentaram área seccional entre 0,5 e 1,5 mm^2 foram utilizados no experimento.

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 estenose aórtica foi realizada pelo teste "*t*" de Student ou Mann-Whitney para amostras independentes.

As comparações entre os grupos no final do experimento, 18 semanas de EAo, foram realizadas pela técnica de análise de variância (ANOVA) para o modelo de dois fatores e complementada com os testes de comparações múltiplas de Bonferroni ou Dunn [75].

As variáveis relacionadas ao estudo funcional do músculo papilar após a realização das diferentes manobras inotrópicas e lusinotrópicas e a ação do isoproterenol foram estudadas pela técnica de análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores e complementada com os testes de comparações múltiplas de Bonferroni [75]. As conclusões estatísticas foram discutidas ao nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS

3.1 – Avaliação dos animais na sexta semana

3.1.1 – Caracterização ecocardiográfica dos grupos Sham e EAo

Na Tabela 1 estão apresentados os dados do exame ecocardiográfico dos animais Sham e EAo. Os animais do grupo EAo apresentaram fração de ejeção, %enc. endo, esp. rel. VE, índice MVE e AE/PC aumentados em relação ao grupo Sham; o AE apresentou o mesmo comportamento, com tendência a apresentar diferença estatística (p=0,063). A VEPP foi diminuída no grupo EAo em relação ao grupo controle..

Tabela 1. Dados ecocardiográficos dos grupos Sham e EAo

Variável	Grupos		*Valor p*
	Sham (n=12)	EAo (n=26)	
FC (bpm)	336 ± 45	319 ± 38	p = 0,225
Fração ejeção	0,92 ± 0,04	0,97 ± 0,03	p < 0,001
% Enc. Endo	57,0 ± 6,2	71,8 ± 7,6	p < 0,001
VEPP (mm/s)	37,7 ± 5,5	33,2 ± 5,4	p = 0,025
E/A#	1,39 (0,78; 1,72)	1,20 (0,74; 7,05)	p = 0,837
Esp. rel. VE	0,38 ± 0,03	0,55 ± 0,06	p < 0,001
Índice MVE (g/kg)	2,19 ± 0,41	3,05 ± 0,82	p = 0,002
AE (mm)	5,32 ± 0,81	5,88 ± 0,84	p = 0,063
AE/AO	1,51 ± 0,21	1,62 ± 0,22	p = 0,159
AE/PC (mm/kg)	18,4 ± 3,0	21,4 ± 3,2	p = 0,009

Sham: grupo controle; EAo: grupo estenose aórtica supravalvar. FC: frequência cardíaca; %Enc.Endo: porcentagem de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo (VE); E/A: relação entre onda E e onda A do fluxo transmitral; Esp.rel.VE: espessura relativa da parede do VE; Índíce MVE: índice de massa do VE; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AE/AO: relação entre diâmetro do átrio esquerdo e diâmetro da aorta; AE/PC: relação entre diâmetro do átrio esquerdo e peso corporal. Dados expressos em média ± desvio padrão, teste "*t*" de Student. #: Dados expressos em mediana e valores mínimo e máximo, teste de Mann-Whitney.

Os dados ecocardiográficos dos grupos EAo, antes de receberem a dieta normolipídica (EAo-Normo) e a dieta hiperlipídica (EAo-Hiper) estão apresentados na Tabela 2. Não houve diferença nas variáveis entre estes grupos.

Tabela 2. Dados ecocardiográficos dos grupos EAo

Variável	Grupos		*Valor p*
	EAo-Normo (n=12)	**EAo-Hiper (n=14)**	
FC (bpm)	323 ± 40	315 ± 36	p = 0,634
Fração ejeção	0,96 ± 0,04	0,98 ± 0,01	p = 0,822
% Enc. Endo	69,0 ± 9,5	74,4 ± 4,1	p = 0,713
VEPP (mm/s)	33,8 ± 6,2	32,7 ± 4,7	p = 0,607
E/A[#]	1,26 (0,74; 7,05)	1,27 (0,73;2,54)	p = 0,456
Esp. rel. VE	0,54 ± 0,07	0,55 ± 0,04	p = 0,628
Índice MVE (g/kg)	3,18 ± 0,84	2,93 ± 0,82	p = 0,449
AE (mm)	5,87 ± 0,95	5,88 ± 0,75	p = 0,959
AE/AO	1,62 ± 0,26	1,62 ± 0,18	p = 0,957
AE/PC (mm/kg)	21,3 ± 4,0	21,4 ± 2,4	p = 0,953

EAo-N: grupo estenose aórtica supravalvar com dieta normolipídica; EAo-H: grupo estenose aórtica supravalvar com dieta hiperlipídica. FC: frequência cardíaca; %Enc.Endo: porcentagem de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo (VE); E/A: relação entre onda E e onda A do fluxo transmitral; Esp.rel.VE: espessura relativa da parede do VE; Índíce MVE: índice de massa do VE; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AE/AO: relação entre diâmetro do átrio esquerdo e diâmetro da aorta; AE/PC: relação entre diâmetro do átrio esquerdo e peso corporal. Dados expressos em média ± desvio padrão, teste "*t*" de Student. [#]: Dados expressos em mediana e valores mínimo e máximo, teste de Mann-Whitney.

3.2 – Avaliação dos animais na décima oitava semana

3.2.1 – Perfil nutricional

O perfil nutricional dos animais ao término do período experimental está apresentado na Tabela 3. No peso corporal final houve diferença apenas entre o EAo-Normo e seu controle. O ganho de peso e a eficiência alimentar foram significantemente maiores nos grupos que receberam a ração hiperlipídica e a ingestão alimentar menor. Os ratos com EAo apresentaram ingestão calórica e alimentar diminuídas em comparação aos animais Sham. O grupo EAo-Hiper apresentou gordura corporal, índice de adiposidade e glicemia menores que o Sham-Hiper. Não houve diferença entre os grupos nos níveis séricos de triacilglicerol e ácidos graxos não esterificados.

Tabela 3. Perfil nutricional dos animais

Variável	Grupo	Dieta		*Valor p*
		Normo	**Hiper**	
Peso corporal final (g)	**Sham**	444 ± 58	466 ± 54	p= 0,231
	EAo	405 ± 44	438 ± 41	p= 0,099
Valor p		p = 0,048	p = 0,135	
Ganho de peso (g)	**Sham**	137 ± 34	164 ± 40	p= 0,026
	EAo	117 ± 24	149 ± 21	p= 0,010
Valor p		p = 0,092	p = 0,225	
Ingestão alimentar (g/dia)	**Sham**	28,6 ± 2,6	23,2 ± 3,0	P< 0,001
	EAo	25,7 ± 3,0	21,0 ± 2,4	P< 0,001
Valor p		p = 0,007	p = 0,037	
Ingestão calórica (kcal/dia)	**Sham**	83,8 ± 7,5	84,4 ± 10,8	p= 0,869
	EAo	75,2 ± 8,7	76,4 ± 8,8	p= 0,746
Valor p		p = 0,017	p = 0,022	
Eficiência alimentar (%)	**Sham**	2,06 ± 0,51	2,42 ± 0,43	P=0,022
	EAo	1,92 ± 0,34	2,37 ± 0,34	p= 0,008
Valor p		p = 0,400	p = 0,754	
Gordura corporal total (g)	**Sham**	20,4 ± 7,6	35,7 ± 10,4	P< 0,001
	EAo	19,1 ± 11,5	24,4 ± 6,3	p= 0,114
Valor p		p = 0,702	p = 0,002	
Índice de adiposidade	**Sham**	4,64 ± 1,17	7,77 ± 1,83	P< 0,001
	EAo	4,67 ± 2,43	5,73 ± 1,25	p= 0,123
Valor p		p = 0,966	p = 0,003	
Glicemia (mg/dL)	**Sham**	93± 15	107 ± 21	p= 0,024
	EAo	90 ± 13	93 ± 13	p= 0,606
Valor p		p = 0,675	p = 0,048	
Triacilglicerol (mg/dL)	**Sham**	49,1 ± 17,5	50,4 ± 16,7	p= 0,879
	EAo	48,4 ± 15,7	51,8 ± 13,8	p= 0,689
Valor p		p = 0,795	p = 0,587	
Ácidos graxos livres não-esterificados (mmol/L)	**Sham**	0,39 ± 0,14	0,35 ± 0,06	p= 0,342
	EAo	0,34 ± 0,08	0,36 ± 0,09	p= 0,684
Valor p		p = 0,546	p = 0,787	

Sham: grupo controle; EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Normo: dieta normolipídica; Hiper: dieta hiperlipídica; Sham-Normo, n=14; Sham-Hiper, n=14; EAo-Normo, n=12; EAo-Hiper, n=14; Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni.

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

A porcentagem de umidade nos tecidos cardíacos, pulmonar e hepático está apresentada na Tabela 4. Não foi visualizada alteração no teor de água entre os grupos, mostrando que os ratos com EAo não apresentam retenção hídrica, ou seja, sinais de insuficiência cardíaca; exceto o Sham-Hiper que mostrou diminuição em relação ao Sham-Normo no tecido hepático.

Tabela 4. Porcentagem (%) de umidade nos tecidos

Variável	Grupo	Dieta		*Valor p*
		Normo	**Hiper**	
VE	**Sham**	73,9 (65,3; 76,62)	76,2 (67,6; 86,2)	p= 0,166
	EAo	76,8 (73,0; 81,4)	76,1 (74,3; 79,0)	p= 0,934
Valor p		p = 0,300	p = 0,729	
VD	**Sham**	75,1 (72,7; 77,0)	75,5 (73,3; 76,6)	p= 0,631
	EAo	76,3 (74,6; 77,8)	76,3 (74,7; 81,1)	p= 0,302
Valor p		p = 0,204	p = 0,809	
AT*	**Sham**	77,4 ± 1,3	77,9 ± 2,2	p= 0,442
	EAo	77,8 ± 1,9	78,1 ± 2,0	p= 0,740
Valor p		p = 0,550	p = 0,840	
Coração	**Sham**	75,5 (70,9; 77,6)	76,6 (71,4; 80,4)	p= 0,427
	EAo	74,4 (74,4; 80,1)	76,8 (74,8; 80,7)	p= 0,156
Valor p		p = 0,301	p = 0,231	
Fígado	**Sham**	68,1 (65,6; 70,7)	66,4 (64,1; 68,3)	p= 0,017
	EAo	68,5 (66,1; 70,5)	67,5 (66,3; 69,4)	p= 0,094
Valor p		p = 0,581	p = 0,254	
Pulmão*	**Sham**	79,0 ± 0,9	79,2 ± 1,2	p= 0,378
	EAo	79,6 ± 3,3	78,4 ± 3,3	p= 0,068
Valor p		p = 0,334	p = 0,074	

Sham: grupo controle; EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Normo: dieta normolipídica; Hiper: dieta hiperlipídica; Sham-Normo, n=14; Sham-Hiper, n=14; EAo-Normo, n=12; EAo-Hiper, n=14; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrio. Dados expressos em mediana e valores mínimo e máximo, ANOVA complementada com Dunn. *Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni.

3.2.3 – Caracterização da remodelação cardíaca

3.2.3.1 – Enzimas reguladoras do metabolismo energético cardíaco

O metabolismo energético cardíaco dos animais está apresentado na Tabela 5. Não houve diferenças entre os grupos nas variáveis PFK e OHADH. Na PDH a ração hiperlipídica elevou a atividade desta enzina no grupo EAo e inversamente, reduziu no Sham; o grupo EAo-Normo apresentou resultado diminuído em relação ao seu respectivo controle.

Tabela 5. Metabolismo energético cardíaco

Variável	Grupo	Dieta		*Valor p*
		Normo	**Hiper**	
PFK (nmol/g tecido)	**Sham**	168 ± 50	188 ± 58	p= 0,467
	EAo	196 ± 61	193 ± 58	p= 0,911
Valor p		p= 0,308	p= 0,831	
PDH (nmol/g tecido)	**Sham**	227 ± 47	197 ± 44	p= 0,035
	EAo	189 ± 69	235 ± 48	p= 0,031
Valor p		p= 0,014	p= 0,074	
OHADH (nmol/mg tecido)	**Sham**	0,30 ± 0,14	0,29 ± 0,12	p= 0,846
	EAo	0,23 ± 0,13	0,28 ± 0,13	p= 0,345
Valor p		p= 0,232	p= 0,921	

Sham: grupo controle; EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Normo: dieta normolipídica; Hiper: dieta hiperlipídica; Sham-Normo, n=14; Sham-Hiper, n=14; EAo-Normo, n=12; EAo-Hiper, n=14; PFK: fosfofrutoquinase; PDH: piruvato desidrogenase; OHADH: beta hidroxiacil CoA desidrogenase. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni.

3.2.3.2 – Macroscopia do coração

A Tabela 6 mostra a estrutura macroscópica cardíaca dos grupos. Os animais com EAo apresentaram peso do VE, dos AT e do coração e as relações VE/tíbia, AT/tíbia e Coração/tíbia maiores que os animais dos grupos controle. Não houve alteração no peso do VD e na sua relação com o comprimento da tíbia.

Tabela 6. Análise macroscópica cardíaca *post mortem*

Variável	Grupo	Dieta		*Valor p*
		Normo	**Hiper**	
VE (g)	**Sham**	0,78 ± 0,10	0,80 ± 0,08	p = 0,713
	EAo	1,27 ± 0,16	1,21 ± 0,17	p = 0,290
Valor p		p < 0,001	p < 0,001	
VD (g)	**Sham**	0,26 ± 0,06	0,27 ± 0,04	p = 0,901
	EAo	0,30 ± 0,08	0,27 ± 0,06	p = 0,332
Valor p		p = 0,163	p = 0,761	
AT (g)	**Sham**	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,01	p = 0,706
	EAo	0,19 ± 0,06	0,17 ± 0,05	p = 0,301
Valor p		p < 0,001	p < 0,001	
Coração (g)	**Sham**	1,14 ± 0,15	1,17 ± 0,11	p = 0,721
	EAo	1,76 ± 0,27	1,65 ± 0,24	p = 0,227
Valor p		p < 0,001	p < 0,001	
Tíbia (cm)	**Sham**	4,26 ± 0,13	4,24 ± 0,10	p = 0,700
	EAo	4,15 ± 0,12	4,21 ± 0,12	p = 0,180
Valor p		p = 0,019	p = 0,478	
VE/tíbia (g/cm)	**Sham**	0,18 ± 0,02	0,19 ± 0,02	p = 0,606
	EAo	0,30 ± 0,04	0,29 ± 0,04	p = 0,207
Valor p		p < 0,001	p < 0,001	
VD/tíbia (g/cm)	**Sham**	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,01	p = 0,887
	EAo	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,01	p = 0,340
Valor p		p = 0,154	p = 0,725	
AT/tíbia (g/cm)	**Sham**	0,02 ± 0,004	0,02 ± 0,003	p = 0,684
	EAo	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01	p = 0,193
Valor p		p < 0,001	p < 0,001	
Coração/tíbia (g/cm)	**Sham**	0,27 ± 0,03	0,28 ± 0,03	p = 0,645
	EAo	0,42 ± 0,06	0,39 ± 0,05	p = 0,162
Valor p		p < 0,001	p < 0,001	

Sham: grupo controle; EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Normo: dieta normolipídica; Hiper: dieta hiperlipídica; Sham-Normo, n=14; Sham-Hiper, n=14; EAo-Normo, n=12; EAo-Hiper, n=14; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso dos átrios; VE/tíbia: relação do peso do ventrículo esquerdo pela tíbia; VD/tíbia: relação do peso do ventrículo direito pela tíbia; AT/tíbia: relação do peso dos átrios pela tíbia; Coração/tíbia: relação do peso do coração pela tíbia. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni.

3.2.3.3 – Estrutura e função do coração por ecocardiograma

Os dados ecocardiográficos obtidos na 18ª semana estão apresentados na Tabela 7. Os grupos EAo-Normo e EAo-Hiper apresentaram esp. rel. VE, índice MVE, AE, AE/AO e AE/PC aumentados em comparação aos grupos Sham-Normo e Sham-Hiper, respectivamente. A variável VEPP foi diminuída no grupo EAo-Hiper vs Sham-Hiper. A ração hierlipídica diminuiu o índice MVE nos ratos com EAo.

Tabela 7. Análise estrutural e funcional ecocardiográfica

Variável	Grupo	Dieta		*Valor p*
		Normo	**Hiper**	
FC (bpm)	**Sham**	288 ± 51	294 ± 52	p = 0,771
	EAo	285 ± 50	270 ± 39	p = 0,422
Valor p		p = 0,871	p = 0,200	
Fração ejeção	**Sham**	0,91 ± 0,04	0,90 ± 0,04	p = 0,699
	EAo	0,92 ± 0,11	0,91 ± 0,12	p = 0,861
Valor p		p = 0,946	p = 0,790	
% Enc. Meso	**Sham**	30,5 ± 3,0	28,5 ± 4,4	p = 0,406
	EAo	29,4 ± 8,0	30,1 ± 8,8	p = 0,764
Valor p		p = 0,660	p = 0,496	
VEPP (mm/s)	**Sham**	37,7 ± 6,3	39,6 ± 5,1	p = 0,400
	EAo	34,3 ± 7,3	32,7 ± 5,2	p = 0,479
Valor p		p = 0,145	p = 0,003	
E/A[#]	**Sham**	1,75 ± 0,40	1,56 ± 0,39	p = 0,730
	EAo	1,88 ± 1,02	2,75 ± 1,55	p = 0,132
Valor p		p = 0,824	p = 0,037	
Esp. rel. VE	**Sham**	0,38 ± 0,04	0,37 ± 0,03	p = 0,643
	EAo	0,57 ± 0,10	0,55 ± 0,07	p = 0,482
Valor p		p < 0,001	p < 0,001,	
Índice MVE (g/kg)	**Sham**	1,67 ± 0,34	1,63 ± 0,24	p = 0,828
	EAo	3,17 ± 0,72	2,75 ± 0,64	p = 0,039
Valor p		p < 0,001	p < 0,001,	
AE (mm)	**Sham**	5,40 ± 0,75	5,39 ± 0,67	p = 0,977
	EAo	6,48 ± 1,58	6,54 ± 1,32	p = 0,898
		p = 0,015	p = 0,010	
AE/AO	**Sham**	1,42 ± 0,19	1,39 ± 0,17	p = 0,757
	EAo	1,66 ± 0,42	1,72 ± 0,45	p = 0,781
Valor p		p = 0,029	p = 0,027	
AE/PC (mm/kg)	**Sham**	12,3 ± 2,3	11,6 ± 1,7	p = 0,574
	EAo	16,1 ± 4,9	15,8 ± 4,1	p = 0,375
Valor p		p = 0,003	p = 0,007	

Sham: grupo controle; EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Normo: dieta normolipídica; Hiper: dieta hiperlipídica; Sham-Normo, n=14; Sham-Hiper, n=14; EAo-Normo, n=12; EAo-Hiper, n=14; FC: frequência cardíaca; %Enc.Meso: porcentagem encurtamento mesocárdico; VEPP: velocidade encurtamento da parede posterior do VE; E/A: relação entre onda E e onda A do fluxo transmitral; Esp.rel.VE: espessura relativa da parede do VE; Índice MVE: índice de massa do VE; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AE/AO: relação entre AE e diâmetro da aorta; AE/PC: relação entre AE e peso corporal. Dados em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni.

3.2.3.4 – Função miocárdica dos músculos papilares isolados

3.2.3.4.1 - Condição basal

A Tabela 8 mostra a função miocárdica basal dos músculos papilares isolados do VE. A ração hiperlipídica não promoveu diferença entre os grupos nas variáveis TD, TR, +dT/dt e –dT/dt. Apenas a TR foi superior nos grupos EAo-Normo e EAo-Hiper em relação aos grupos Sham-Normo e Sham-Hiper, respectivamente. As áreas seccionais dos músculos papilares apresentaram comportamento semelhante entre os grupos.

Tabela 8. Função miocárdica basal

Variável	Grupo	Dieta Saturada		*Valor p*
		Normo	Hiper	
TD (g/mm²)	**Sham**	6,45 ± 1,74	6,47 ± 1,42	p= 0,971
	EAo	6,11 ± 1,01	6,28 ± 2,00	p= 0,789
Valor p		p= 0,600	p= 0,761	
TR (g/mm²)	**Sham**	0,66 ± 0,16	0,66 ± 0,21	p= 0,994
	EAo	0,97 ± 0,41	1,07 ± 0,30	p= 0,398
Valor p		P<0,001	P<0,001	
+dT/dt (g/mm²/s)	**Sham**	71,1 ± 18,8	73,4 ± 19,5	p= 0,740
	EAo	59,9 ± 11,9	65,6 ± 21,1	p= 0,436
Valor p		p= 0,133	p= 0,274	
-dT/dt (g/mm²/s)	**Sham**	25,2 ± 6,5	27,3 ± 6,3	p= 0,431
	EAo	26,1 ± 6,5	27,7 ± 8,1	p= 0,574
Valor p		p= 0,724	p= 0,872	
AS (g/mm²)	**Sham**	1,04 ± 0,22	1,03 ± 0,25	p= 0,689
	EAo	1,20 ± 0,17	1,13 ± 0,21	p= 0,452
Valor p		p= 0,121	p= 0,203	

Sham: grupo controle; EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Normo: dieta normolipídica; Hiper: dieta hiperlipídica; Sham-Normo, n=14; Sham-Hiper, n=14; EAo-Normo, n=12; EAo-Hiper, n=14; TD: tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida; AS: área seccional dos músculos papilares. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni.

3.2.3.4.2 - Potenciação pós-pausa

Os efeitos da potenciação pós-pausa do estímulo elétrico, na função do músculo papilar, estão apresentados nas Tabelas 9, 10, 11 e 12. Não foram observadas alterações produzidas pela ração hiperlipídica nas variáveis TD, TR, +dT/dt e –dT/dt entre os grupos. Os grupos EAo-Normo e EAo-Hiper apresentaram valores elevados na TR e diminuídos na +dT/dt em relação os grupos Sham-Normo e Sham-Hiper, respectivamente, em todos os momentos. A análise intra-grupo mostrou que ambos apresentaram capacidade de resposta similar a PPP, visualizada por elevação nos valores da TD, +dT/dt e –dT/dt e, queda nos valores da TR.

Tabela 9. Efeito da potenciação pós-pausa (PPP) na tensão desenvolvida

		PPP (seg)		
Grupos	**Basal**	**10**	**30**	**60**
Sham-Normo	$4,67 \pm 1,23^{\alpha}$	$5,62 \pm 1,44^{\beta}$	$6,32 \pm 1,59^{\gamma}$	$6,51 \pm 1,65^{\gamma}$
Sham-Hiper	$4,09 \pm 1,22^{\alpha}$	$5,00 \pm 1,18^{\beta}$	$5,82 \pm 1,27^{\gamma}$	$6,11 \pm 1,27^{\gamma}$
EAo-Normo	$4,47 \pm 0,74^{\alpha}$	$5,19 \pm 0,80^{\beta}$	$5,72 \pm 1,00^{\gamma}$	$5,90 \pm 1,07^{\gamma}$
EAo-Hiper	$4,41 \pm 1,50^{\alpha}$	$5,23 \pm 1,88^{\beta}$	$5,92 \pm 2,24^{\gamma}$	$6,20 \pm 2,39^{\gamma}$

EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Sham-Normo: grupo controle tratado com dieta normolipídica , n=14; Sham-Hiper: grupo controle tratado com dieta hiperlipídica, n=14; EAo-Normo: grupo EAo tratado com dieta normolipídica, n=12; EAo-Hiper: grupo EAo tratado com dieta hiperlipídica, n=14. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni. Letras gregas diferentes indicam diferenças de momentos fixado o grupo.

Tabela 10. Efeito da potenciação pós-pausa (PPP) na tensão de repouso

		PPP (seg)		
Grupos	**Basal**	**10**	**30**	**60**
Sham-Normo	$0,55 \pm 0,13^{\beta}$	$0,55 \pm 0,13^{\beta}$	$0,54 \pm 0,13^{\alpha}$	$0,53 \pm 0,12^{\alpha}$
Sham-Hiper	$0,59 \pm 0,22^{\beta}$	$0,59 \pm 0,21^{\beta}$	$0,56 \pm 0,20^{\alpha}$	$0,54 \pm 0,19^{\alpha}$
EAo-Normo	$0,92 \pm 0,41^{*\beta}$	$0,91 \pm 0,41^{*\beta}$	$0,89 \pm 0,40^{*\beta}$	$0,85 \pm 0,40^{*\alpha}$
EAo-Hiper	$0,99 \pm 0,29^{\#\gamma}$	$0,98 \pm 0,29^{\#\gamma}$	$0,95 \pm 0,28^{\#\beta}$	$0,92 \pm 0,26^{\#\alpha}$

EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Sham-Normo: grupo controle tratado com dieta normolipídica, n=14; Sham-Hiper: grupo controle tratado com dieta hiperlipídica, n=14; EAo-Normo: grupo EAo tratado com dieta normolipídica, n=12; EAo-Hiper: grupo EAo tratado com dieta hiperlipídica, n=14. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni. Letras gregas diferentes indicam diferenças de momentos fixado o grupo. *: EAo-Normo *vs* Sham-Normo. #: EAo-Hiper *vs* Sham-Hiper.

Tabela 11. Efeito da potenciação pós-pausa (PPP) na velocidade de elevação da tensão desenvolvida

		PPP (seg)		
Grupos	**Basal**	**10**	**30**	**60**
Sham-Normo	$49,3 \pm 10,8^{\alpha}$	$60,1 \pm 13,7^{\beta}$	$68,9 \pm 16,3^{\gamma}$	$71,5 \pm 17,9^{\gamma}$
Sham-Hiper	$45,5 \pm 12,0^{\alpha}$	$55,2 \pm 11,5^{\beta}$	$64,3 \pm 14,0^{\gamma}$	$69,3 \pm 14,5^{\theta}$
EAo-Normo	$40,8 \pm 7,8^{*\alpha}$	$47,4 \pm 8,6^{*\beta}$	$50,1 \pm 10,0^{*\beta\gamma}$	$53,4 \pm 12,4^{*\gamma}$
EAo-Hiper	$40,5 \pm 12,2^{\#\alpha}$	$47,9 \pm 15,0^{\#\beta}$	$55,9 \pm 18,0^{\#\gamma}$	$59,6 \pm 21,5^{\#\gamma}$

EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Sham-Normo: grupo controle tratado com dieta normolipídica, n=14; Sham-Hiper: grupo controle tratado com dieta hiperlipídica, n=14; EAo-Normo: grupo EAo tratado com dieta normolipídica, n=12; EAo-Hiper: grupo EAo tratado com dieta hiperlipídica, n=14. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni. Letras gregas diferentes indicam diferenças de momentos fixado o grupo. *: EAo-Normo *vs* Sham-Normo. #: EAo-Hiper *vs* Sham-Hiper.

Tabela 12. Efeito da potenciação pós-pausa (PPP) na velocidade de decréscimo da tensão desenvolvida

		PPP (seg)		
Grupos	**Basal**	**10**	**30**	**60**
Sham-Normo	$20,8 \pm 4,6^{\alpha}$	$23,4 \pm 5,3^{\alpha\beta}$	$25,9 \pm 6,6^{\beta\gamma}$	$27,3 \pm 7,4^{\gamma}$
Sham-Hiper	$20,4 \pm 5,7^{\alpha}$	$23,8 \pm 5,5^{\beta}$	$26,8 \pm 6,9^{\gamma}$	$29,4 \pm 7,1^{\gamma}$
EAo-Normo	$21,0 \pm 5,2^{\alpha}$	$23,4 \pm 5,4^{\alpha\beta}$	$24,1 \pm 5,3^{\beta\gamma}$	$26,4 \pm 6,7^{\gamma}$
EAo-Hiper	$20,3 \pm 5,9^{\alpha}$	$22,7 \pm 6,4^{\alpha\beta}$	$25,6 \pm 7,2^{\beta\gamma}$	$27,5 \pm 9,1^{\gamma}$

EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Sham-Normo: grupo controle tratado com dieta normolipídica, n=14; Sham-Hiper: grupo controle tratado com dieta hiperlipídica, n=14; EAo-Normo: grupo EAo tratado com dieta normolipídica, n=12; EAo-Hiper: grupo EAo tratado com dieta hiperlipídica, n=14. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni. Letras gregas diferentes indicam diferenças de momentos fixado o grupo.

3.2.3.4.3 - Elevação da concentração extracelular de cálcio

Os efeitos da elevação da concentração de cálcio extracelular, na função do músculo papilar, estão apresentados nas Tabelas 13, 14, 15 e 16. Não foram observadas alterações produzidas pela ração hiperlipídica nas variáveis TD, TR, +dT/dt e –dT/dt entre os grupos. Os grupos EAo-Normo e EAo-Hiper apresentaram valores elevados na TR e diminuídos na +dT/dt em relação os grupos Sham-Normo e Sham-Hiper, respectivamente, em todos os momentos. A análise intra-grupo mostrou que ambos apresentaram capacidade de resposta similar ao cálcio, visualizada por elevação nos valores da TD, +dT/dt e –dT/dt e, queda nos valores da TR.

Tabela 13. Efeito da elevação da concentração de cálcio extracelular (Ca^{2+}) na tensão desenvolvida

	Ca^{2+} (mM)						
Grupos	**0,5**	**1,0**	**1,5**	**2,0**	**2,5**	**3,0**	**3,5**
Sham-Normo	$4,48 \pm 1,19^{\alpha}$	$5,19 \pm 1,40^{\beta}$	$5,71 \pm 1,47^{\gamma}$	$5,98 \pm 1,49^{\gamma\theta}$	$6,19 \pm 1,54^{\theta\delta}$	$6,35 \pm 1,65^{\delta}$	$6,42 \pm 1,64^{\delta}$
Sham-Hiper	$4,01 \pm 1,24^{\alpha}$	$4,69 \pm 1,35^{\beta}$	$5,26 \pm 1,38^{\gamma}$	$5,66 \pm 1,40^{\theta}$	$5,90 \pm 1,35^{\theta\delta}$	$6,07 \pm 1,30^{\delta}$	$6,19 \pm 1,29^{\delta}$
EAo-Normo	$4,26 \pm 0,76^{\alpha}$	$4,72 \pm 0,80^{\alpha}$	$5,15 \pm 0,86^{\beta}$	$5,39 \pm 0,85^{\beta\gamma}$	$5,62 \pm 0,88^{\gamma\theta}$	$5,81 \pm 0,91^{\theta}$	$5,93 \pm 0,96^{\theta}$
EAo-Hiper	$4,22 \pm 1,53^{\alpha}$	$4,76 \pm 1,70^{\alpha}$	$5,21 \pm 1,82^{\beta}$	$5,49 \pm 1,92^{\beta\gamma}$	$5,70 \pm 1,92^{\gamma\theta}$	$5,87 \pm 1,98^{\gamma\theta}$	$5,99 \pm 2,14^{\theta}$

EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Sham-Normo: grupo controle tratado com dieta normolipídica, n=14; Sham-Hiper: grupo controle tratado com dieta hiperlipídica, n=14; EAo-Normo: grupo EAo tratado com dieta normolipídica, n=12; EAo-Hiper: grupo EAo tratado com dieta hiperlipídica, n=14. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni. Letras gregas diferentes indicam diferenças de momentos fixado o grupo.

Tabela 14. Efeito da elevação da concentração de cálcio extracelular (Ca^{2+}) na tensão de repouso

	Ca^{2+} (mM)						
Grupos	**0,5**	**1,0**	**1,5**	**2,0**	**2,5**	**3,0**	**3,5**
Sham-Normo	$0,53 \pm 0,15^{\theta}$	$0,51 \pm 0,12^{\gamma}$	$0,51 \pm 0,11^{\beta\gamma}$	$0,50 \pm 0,11^{\alpha\beta\gamma}$	$0,49 \pm 0,12^{\alpha\beta}$	$0,49 \pm 0,12^{\alpha\beta}$	$0,48 \pm 0,12^{\alpha}$
Sham-Hiper	$0,55 \pm 0,19^{\beta}$	$0,53 \pm 0,18^{\alpha}$	$0,51 \pm 0,18^{\alpha}$	$0,51 \pm 0,17^{\alpha}$	$0,50 \pm 0,18^{\alpha}$	$0,51 \pm 0,18^{\alpha}$	$0,50 \pm 0,19^{\alpha}$
EAo-Normo	$0,86 \pm 0,40^{*\beta}$	$0,83 \pm 0,39^{*\alpha}$	$0,82 \pm 0,38^{*\alpha}$	$0,81 \pm 0,38^{*\alpha}$	$0,81 \pm 0,37^{*\alpha}$	$0,80 \pm 0,37^{*\alpha}$	$0,79 \pm 0,36^{*\alpha}$
EAo-Hiper	$0,91 \pm 0,27^{\#\gamma}$	$0,89 \pm 0,26^{\#\beta}$	$0,87 \pm 0,26^{\#\alpha\beta}$	$0,86 \pm 0,27^{\#\alpha\beta}$	$0,86 \pm 0,25^{\#\alpha\beta}$	$0,85 \pm 0,24^{\#\alpha\beta}$	$0,85 \pm 0,25^{\#\alpha}$

EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Sham-Normo: grupo controle tratado com dieta normolipídica, n=14; Sham-Hiper: grupo controle tratado com dieta hiperlipídica, n=14; EAo-Normo: grupo EAo tratado com dieta normolipídica, n=12; EAo-Hiper: grupo EAo tratado com dieta hiperlipídica, n=14. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni. Letras gregas diferentes indicam diferenças de momentos fixado o grupo. *: EAo-Normo *vs* Sham-Normo. #: EAo-Hiper *vs* Sham-Hiper.

Tabela 15. Efeito da elevação da concentração de cálcio extracelular (Ca^{2+}) na velocidade de elevação da tensão desenvolvida

	Ca^{2+} (mM)						
Grupos	**0,5**	**1,0**	**1,5**	**2,0**	**2,5**	**3,0**	**3,5**
Sham-Normo	$49,8 \pm 10,5^{\alpha}$	$56,5 \pm 13,5^{\beta}$	$63,9 \pm 15,2^{\gamma}$	$66,0 \pm 14,2^{\gamma\theta}$	$69,0 \pm 14,5^{\gamma\theta\delta}$	$71,7 \pm 18,4^{\theta\delta}$	$73,1 \pm 17,8^{\delta}$
Sham-Hiper	$46,7 \pm 11,8^{\alpha}$	$52,7 \pm 14,1^{\beta}$	$60,1 \pm 13,9^{\gamma}$	$65,9 \pm 14,3^{\gamma\theta}$	$68,7 \pm 15,1^{\theta\delta}$	$69,7 \pm 14,8^{\theta\delta}$	$73,4 \pm 16,1^{\delta}$
EAo-Normo	$39,4 \pm 7,9^{*\alpha}$	$42,9 \pm 7,5^{*\alpha}$	$49,0 \pm 9,4^{*\beta}$	$51,4 \pm 9,4^{*\beta}$	$53,4 \pm 9,1^{*\beta\gamma}$	$56,1 \pm 10,6^{*\gamma\theta}$	$60,2 \pm 11,5^{*\theta}$
EAo-Hiper	$39,6 \pm 11,7^{\#\alpha}$	$45,0 \pm 13,5^{\#\alpha}$	$51,6 \pm 15,8^{\#\beta}$	$55,1 \pm 18,7^{\#\beta\gamma}$	$56,4 \pm 18,2^{\#\beta\gamma}$	$59,3 \pm 18,2^{\#\gamma\theta}$	$63,4 \pm 20,3^{\#\theta}$

EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Sham-Normo: grupo controle tratado com dieta normolipídica, n=14; Sham-Hiper: grupo controle tratado com dieta hiperlipídica, n=14; EAo-Normo: grupo EAo tratado com dieta normolipídica, n=12; EAo-Hiper: grupo EAo tratado com dieta hiperlipídica, n=14. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni. Letras gregas diferentes indicam diferenças de momentos fixado o grupo. *: EAo-Normo *vs* Sham-Normo. #: EAo-Hiper *vs* Sham-Hiper.

Tabela 16. Efeito da elevação da concentração de cálcio extracelular (Ca^{2+}) na velocidade de decréscimo da tensão desenvolvida

	Ca^{2+} (mM)						
Grupos	**0,5**	**1,0**	**1,5**	**2,0**	**2,5**	**3,0**	**3,5**
Sham-Normo	$19,9 \pm 5,2^{\alpha}$	$24,2 \pm 5,7^{\beta}$	$26,9 \pm 6,8^{\beta\gamma}$	$26,5 \pm 6,2^{\beta\gamma}$	$26,7 \pm 5,9^{\beta\gamma}$	$27,5 \pm 7,0^{\gamma}$	$28,2 \pm 7,0^{\gamma}$
Sham-Hiper	$20,1 \pm 5,9^{\alpha}$	$24,3 \pm 6,1^{\beta}$	$27,6 \pm 6,4^{\gamma}$	$29,5 \pm 6,3^{\gamma\theta}$	$29,4 \pm 6,5^{\gamma\theta}$	$29,2 \pm 5,2^{\gamma\theta}$	$31,3 \pm 5,5^{\theta}$
EAo-Normo	$20,8 \pm 4,8^{\alpha}$	$23,0 \pm 4,4^{\alpha}$	$26,1 \pm 5,5^{\beta}$	$26,6 \pm 5,2^{\beta}$	$26,2 \pm 5,1^{\beta}$	$27,4 \pm 6,5^{\beta}$	$29,0 \pm 6,7^{\beta}$
EAo-Hiper	$20,7 \pm 6,1^{\alpha}$	$23,3 \pm 6,3^{\alpha}$	$26,4 \pm 7,5^{\beta}$	$27,3 \pm 8,9^{\beta}$	$26,6 \pm 8,5^{\beta}$	$27,2 \pm 7,6^{\beta}$	$28,9 \pm 8,9^{\beta}$

EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Sham-Normo: grupo controle tratado com dieta normolipídica, n=14; Sham-Hiper: grupo controle tratado com dieta hiperlipídica, n=14; EAo-Normo: grupo EAo tratado com dieta normolipídica, n=12; EAo-Hiper: grupo EAo tratado com dieta hiperlipídica, n=14. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni. Letras gregas diferentes indicam diferenças de momentos fixado o grupo.

3.2.3.4.4 - Elevação da frequência cardíaca

Os efeitos da alteração da frequência de estímulo, na função do músculo papilar, estão apresentados nas Tabelas 17, 18, 19 e 20. Não foram observadas alterações produzidas pela ração hiperlipídica nas variáveis TD, TR, +dT/dt e –dT/dt entre os grupos. Os grupos EAo-Normo e EAo-Hiper em relação os grupos Sham-Normo e Sham-Hiper, respectivamente, apresentaram valores elevados na TR em todos os momentos, diminuídos na +dT/dt nos momentos 0,2, 0,8 e 1,0 Hz e diminuídos na -dT/dt nos momentos 0,8 e 1,0 Hz. A análise intra-grupo mostrou que ambos apresentaram capacidade de resposta similar a elevação da frequência de estímulo, visualizada por diminuição nos valores da TD, +dT/dt e –dT/dt e, aumento nos valores da TR.

Tabela 17. Efeito da elevação da frequência cardíaca (FC) na tensão desenvolvida

	FC (Hz)				
Grupos	**0,2**	**0,4**	**0,6**	**0,8**	**1,0**
Sham-Normo	$5,43 \pm 1,56^{\theta}$	$4,28 \pm 1,38^{\gamma}$	$3,65 \pm 1,20^{\beta}$	$3,30 \pm 1,02^{\alpha\beta}$	$3,00 \pm 0,87^{\alpha}$
Sham-Hiper	$4,88 \pm 1,33^{\delta}$	$3,79 \pm 1,36^{\theta}$	$3,30 \pm 1,25^{\gamma}$	$2,99 \pm 1,15^{\beta}$	$2,69 \pm 1,05^{\alpha}$
EAo-Normo	$5,05 \pm 0,83^{\delta}$	$3,97 \pm 0,70^{\theta}$	$3,33 \pm 0,62^{\gamma}$	$2,86 \pm 0,53^{\beta}$	$2,41 \pm 0,47^{\alpha}$
EAo-Hiper	$5,06 \pm 1,81^{\theta}$	$4,03 \pm 1,33^{\gamma}$	$3,46 \pm 1,11^{\beta}$	$3,05 \pm 0,96^{\alpha\beta}$	$2,60 \pm 0,82^{\alpha}$

EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Sham-Normo: grupo controle tratado com dieta normolipídica, n=14; Sham-Hiper: grupo controle tratado com dieta hiperlipídica, n=14; EAo-Normo: grupo EAo tratado com dieta normolipídica, n=12; EAo-Hiper: grupo EAo tratado com dieta hiperlipídica, n=14. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni. Letras gregas diferentes indicam diferenças de momentos fixado o grupo.

Tabela 18. Efeito da elevação da frequência cardíaca (FC) na tensão de repouso

	FC (Hz)				
Grupos	**0,2**	**0,4**	**0,6**	**0,8**	**1,0**
Sham-Normo	$0,46 \pm 0,12^{\alpha}$	$0,46 \pm 0,12^{\alpha}$	$0,47 \pm 0,12^{\alpha}$	$0,48 \pm 0,14^{\alpha\beta}$	$0,54 \pm 0,20^{\beta}$
Sham-Hiper	$0,47 \pm 0,18^{\alpha}$	$0,46 \pm 0,18^{\alpha}$	$0,48 \pm 0,17^{\alpha}$	$0,51 \pm 0,17^{\alpha}$	$0,59 \pm 0,20^{\beta}$
EAo-Normo	$0,76 \pm 0,36^{*\alpha}$	$0,76 \pm 0,36^{*\alpha}$	$0,77 \pm 0,35^{*\alpha}$	$0,81 \pm 0,35^{*\alpha}$	$0,91 \pm 0,35^{*\beta}$
EAo-Hiper	$0,79 \pm 0,22^{\#\alpha}$	$0,79 \pm 0,20^{\#\alpha}$	$0,79 \pm 0,21^{\#\alpha}$	$0,84 \pm 0,23^{\#\alpha\beta}$	$0,92 \pm 0,29^{\#\beta}$

EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Sham-Normo: grupo controle tratado com dieta normolipídica, n=14; Sham-Hiper: grupo controle tratado com dieta hiperlipídica, n=14; EAo-Normo: grupo EAo tratado com dieta normolipídica, n=12; EAo-Hiper: grupo EAo tratado com dieta hiperlipídica, n=14. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni. Letras gregas diferentes indicam diferenças de momentos fixado o grupo. *: EAo-Normo *vs* Sham-Normo. #: EAo-Hiper *vs* Sham-Hiper.

Tabela 19. Efeito da elevação da frequência cardíaca (FC) na velocidade de elevação da tensão desenvolvida

	FC (Hz)				
Grupos	**0,2**	**0,4**	**0,6**	**0,8**	**1,0**
Sham-Normo	$59,0 \pm 15,1^{\gamma}$	$47,7 \pm 13,3^{\beta}$	$42,5 \pm 11,1^{\alpha}$	$40,7 \pm 9,7^{\alpha}$	$38,4 \pm 8,4^{\alpha}$
Sham-Hiper	$55,8 \pm 12,3^{\theta}$	$44,8 \pm 13,3^{\gamma}$	$40,7 \pm 12,6^{\beta}$	$38,8 \pm 11,7^{\alpha\beta}$	$36,9 \pm 11,9^{\alpha}$
EAo-Normo	$48,1 \pm 8,7^{*\delta}$	$39,4 \pm 7,3^{\theta}$	$34,3 \pm 6,1^{\gamma}$	$31,3 \pm 5,9^{*\beta}$	$27,7 \pm 5,2^{*\alpha}$
EAo-Hiper	$49,3 \pm 16,5^{\#\theta}$	$41,8 \pm 12,1^{\gamma}$	$37,7 \pm 10,9^{\beta}$	$34,4 \pm 9,6^{\#\alpha\beta}$	$30,5 \pm 7,8^{\#\alpha}$

EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Sham-Normo: grupo controle tratado com dieta normolipídica, n=14; Sham-Hiper: grupo controle tratado com dieta hiperlipídica, n=14; EAo-Normo: grupo EAo tratado com dieta normolipídica, n=12; EAo-Hiper: grupo EAo tratado com dieta hiperlipídica, n=14. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni. Letras gregas diferentes indicam diferenças de momentos fixado o grupo. *: EAo-Normo *vs* Sham-Normo. $^{\#}$: EAo-Hiper *vs* Sham-Hiper.

Tabela 20. Efeito da elevação da frequência cardíaca (FC) na velocidade de decréscimo da tensão desenvolvida

	FC (Hz)				
Grupos	**0,2**	**0,4**	**0,6**	**0,8**	**1,0**
Sham-Normo	$25,0 \pm 6,4^{\gamma}$	$21,4 \pm 5,0^{\beta}$	$19,3 \pm 3,9^{\alpha\beta}$	$18,3 \pm 3,6^{\alpha}$	$17,4 \pm 3,2^{\alpha}$
Sham-Hiper	$26,6 \pm 5,5^{\gamma}$	$22,3 \pm 5,9^{\beta}$	$20,0 \pm 5,8^{\alpha}$	$19,1 \pm 6,1^{\alpha}$	$18,5 \pm 5,9^{\alpha}$
EAo-Normo	$25,6 \pm 5,2^{\theta}$	$20,1 \pm 4,4^{\gamma}$	$16,8 \pm 2,9^{\beta}$	$15,2 \pm 2,5^{*\alpha\beta}$	$13,6 \pm 2,3^{*\alpha}$
EAo-Hiper	$24,9 \pm 8,2^{\theta}$	$20,4 \pm 5,2^{\gamma}$	$18,0 \pm 4,9^{\beta\gamma}$	$16,1 \pm 4,5^{\#\alpha\beta}$	$14,0 \pm 3,5^{\#\alpha}$

EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Sham-Normo: grupo controle tratado com dieta normolipídica, n=14; Sham-Hiper: grupo controle tratado com dieta hiperlipídica, n=14; EAo-Normo: grupo EAo tratado com dieta normolipídica, n=12; EAo-Hiper: grupo EAo tratado com dieta hiperlipídica, n=14. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni. Letras gregas diferentes indicam diferenças de momentos fixado o grupo. *: EAo-Normo *vs* Sham-Normo. $^{\#}$: EAo-Hiper *vs* Sham-Hiper.

3.2.3.4.5 - Estímulo da via beta-adrenérgica

Os efeitos da adição do isoproterenol, na função do músculo papilar, estão apresentados nas Tabelas 21, 22, 23 e 24. Não foram observadas alterações produzidas pela ração hiperlipídica nas variáveis TD, TR, +dT/dt e –dT/dt entre os grupos. Os grupos EAo-Normo e EAo-Hiper em relação os grupos Sham-Normo e Sham-Hiper, respectivamente, apresentaram valores: elevados na TR e diminuidos na +dT/dt em todos os momentos e, diminuídos nas variáveis TD e -dT/dt nas doses 10^{-7} e 10^{-6}. A análise intra-grupo mostrou que ambos apresentaram capacidade de resposta similar ao isoproterenol, visualizada por queda na TR e, elevação nos valores da +dT/dt e –dT/dt. Na variável TD apenas os grupos Shans apresentaram elevação.

Tabela 21. Efeito do isoproterenol (ISO) na tensão desenvolvida

		ISO (M)		
Grupos	**Basal**	**10-8**	**10-7**	**10-6**
Sham-Normo	$5,05 \pm 1,46^{\alpha}$	$5,23 \pm 1,43^{\alpha}$	$5,70 \pm 1,53^{\beta}$	$5,78 \pm 1,47^{\beta}$
Sham-Hiper	$4,53 \pm 1,33^{\alpha}$	$4,72 \pm 1,29^{\alpha}$	$5,23 \pm 1,07^{\beta}$	$5,60 \pm 1,13^{\beta}$
EAo-Normo	$4,75 \pm 0,79^{\alpha}$	$4,70 \pm 0,77^{\alpha}$	$4,63 \pm 0,96^{*\alpha}$	$4,58 \pm 0,97^{*\alpha}$
EAo-Hiper	$4,75 \pm 1,71^{\alpha}$	$4,80 \pm 1,77^{\alpha}$	$4,69 \pm 1,67^{\#\alpha}$	$4,72 \pm 1,68^{\#\alpha}$

EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Sham-Normo: grupo controle tratado com dieta normolipídica, n=14; Sham-Hiper: grupo controle tratado com dieta hiperlipídica, n=14; EAo-Normo: grupo EAo tratado com dieta normolipídica, n=12; EAo-Hiper: grupo EAo tratado com dieta hiperlipídica, n=14. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni. Letras gregas diferentes indicam diferenças de momentos fixado o grupo. *: EAo-Normo *vs* Sham-Normo. #: EAo-Hiper *vs* Sham-Hiper.

Tabela 22. Efeito do isoproterenol (ISO) na tensão de repouso

		ISO (M)		
Grupos	**Basal**	**10-8**	**10-7**	**10-6**
Sham-Normo	$0,43 \pm 0,12^{\beta}$	$0,43 \pm 0,12^{\beta}$	$0,41 \pm 0,12^{\alpha}$	$0,41 \pm 0,12^{\alpha}$
Sham-Hiper	$0,43 \pm 0,18^{\beta}$	$0,42 \pm 0,18^{\alpha\beta}$	$0,42 \pm 0,17^{\alpha\beta}$	$0,41 \pm 0,17^{\alpha}$
EAo-Normo	$0,76 \pm 0,36^{*\beta}$	$0,75 \pm 0,35^{*\alpha\beta}$	$0,74 \pm 0,34^{*\alpha}$	$0,74 \pm 0,34^{*\alpha}$
EAo-Hiper	$0,78 \pm 0,23^{\#\beta}$	$0,78 \pm 0,26^{\#\beta}$	$0,77 \pm 0,26^{\#\alpha}$	$0,76 \pm 0,28^{\#\alpha}$

EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Sham-Normo: grupo controle tratado com dieta normolipídica, n=14; Sham-Hiper: grupo controle tratado com dieta hiperlipídica, n=14; EAo-Normo: grupo EAo tratado com dieta normolipídica, n=12; EAo-Hiper: grupo EAo tratado com dieta hiperlipídica, n=14. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni. Letras gregas diferentes indicam diferenças de momentos fixado o grupo. *: EAo-Normo *vs* Sham-Normo. #: EAo-Hiper *vs* Sham-Hiper.

Tabela 23. Efeito do isoproterenol (ISO) na velocidade de elevação da tensão desenvolvida

		ISO (M)		
Grupos	**Basal**	**10-8**	**10-7**	**10-6**
Sham-Normo	$54,8 \pm 14,5^{\alpha}$	$58,7 \pm 13,2^{\alpha}$	$69,1 \pm 16,3^{\beta}$	$77,6 \pm 16,8^{\gamma}$
Sham-Hiper	$51,8 \pm 12,6^{\alpha}$	$54,4 \pm 11,8^{\alpha}$	$66,1 \pm 12,4^{\beta}$	$78,0 \pm 16,0^{\gamma}$
EAo-Normo	$43,5 \pm 7,8^{*\alpha}$	$45,4 \pm 8,0^{*\alpha\beta}$	$49,5 \pm 11,8^{*\beta\gamma}$	$53,0 \pm 13,6^{*\gamma}$
EAo-Hiper	$45,9 \pm 14,4^{\#\alpha}$	$48,8 \pm 17,1^{\#\alpha\beta}$	$53,7 \pm 16,6^{\#\beta\gamma}$	$57,4 \pm 17,9^{\#\gamma}$

EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Sham-Normo: grupo controle tratado com dieta normolipídica, n=14; Sham-Hiper: grupo controle tratado com dieta hiperlipídica, n=14; EAo-Normo: grupo EAo tratado com dieta normolipídica, n=12; EAo-Hiper: grupo EAo tratado com dieta hiperlipídica, n=14. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni. Letras gregas diferentes indicam diferenças de momentos fixado o grupo. *: EAo-Normo *vs* Sham-Normo. #: EAo-Hiper *vs* Sham-Hiper.

Tabela 24. Efeito do isoproterenol (ISO) na velocidade de decréscimo da tensão desenvolvida

		ISO (M)		
Grupos	**Basal**	**10-8**	**10-7**	**10-6**
Sham-Normo	$23,0 \pm 5,3^{\alpha}$	$26,3 \pm 5,6^{\alpha}$	$31,1 \pm 6,4^{\beta}$	$41,7 \pm 9,7^{\gamma}$
Sham-Hiper	$25,2 \pm 6,4^{\alpha}$	$26,6 \pm 5,^{\alpha}$	$33,5 \pm 5,7^{\beta}$	$45,9 \pm 9,9^{\gamma}$
EAo-Normo	$22,0 \pm 4,4^{\alpha}$	$23,9 \pm 4,7^{\alpha\beta}$	$27,5 \pm 6,3^{*\beta}$	$35,2 \pm 9,1^{*\gamma}$
EAo-Hiper	$22,4 \pm 6,3^{\alpha}$	$23,3 \pm 7,2^{\alpha}$	$29,1 \pm 9,1^{\#\beta}$	$37,2 \pm 12,1^{\#\gamma}$

EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Sham-Normo: grupo controle tratado com dieta normolipídica, n=14; Sham-Hiper: grupo controle tratado com dieta hiperlipídica, n=14; EAo-Normo: grupo EAo tratado com dieta normolipídica, n=12; EAo-Hiper: grupo EAo tratado com dieta hiperlipídica, n=14. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA complementada com Bonferroni. Letras gregas diferentes indicam diferenças de momentos fixado o grupo. *: EAo-Normo *vs* Sham-Normo. #: EAo-Hiper *vs* Sham-Hiper.

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como proposta testar a hipótese de que a maior disponibilidade de energia, proveniente dos lipídeos ricos em ácidos graxos saturados, restaura o equilíbrio energético miocárdico, atenuando o processo de remodelação patológica no modelo de sobrecarga pressórica crônica. Os dados deste estudo evidenciaram que a dieta hiperlipídica promoveu mudanças no perfil nutricional e não atenuou a hipertrofia ventricular esquerda e não promoveu melhoria na função cardíaca.

4.1 – Dietas hiperlipídicas

Na literatura, existem inúmeras pesquisas conduzidas com a utilização de tratamentos dietéticos, ajustados diretamente aos seus objetivos de estudo [47-57]. A formulação de rações é o fruto da alteração no tipo dos ingredientes ou na quantidade e/ou devido a adição de fármacos. Diversos trabalhos confeccionaram suas rações por simples adição do composto de interesse; entretanto, a adição de um componente, em elevada quantidade, produz diluição nos demais componentes da ração, o que pode interferir nas conclusões do trabalho. Estudos prévios, do nosso grupo, empregando rações hiperlipídicas para desenvolvimento de obesidade em animais, mostraram redução nos níveis de hidratos de carbono em relação à dieta padrão; como mencionado acima, essa mudanças podem interferir na definição do fator responsável pelos resultados observados nos trabalhos [59,60,76]. Este viés metodológico é observado na grande maioria da literatura mundial [47-57]. Em virtude de ter a meta de analisar essencialmente a influência da elevação da quantidade de gordura, foram confeccionadas para este estudo, rações normolipídica e hiperlipídica ricas em ácidos graxos saturados, apresentando equilíbrio na quantidade dos

hidratos de carbono (Quadros 1 e 2). Os dois principais componentes energéticos das rações são os lipídeos e os carboidratos; visto que há equilíbrio dos hidratos de carbono, a presente composição das rações nos leva a inferir que as possíveis alterações obtidas nos ratos são oriundas da alteração da quantidade de gordura da ração.

4.2 – Estrutura e função por ecocardiograma na 6ª semana

Em virtude deste trabalho utilizar ratos com EAo apresentando alterações estruturais e funcionais cardíacas, hipertrofia do VE e disfunção diastólica, foi realizada a análise desses animais seis semanas após o procedimento cirúrgico, em razão de estudos prévios mostrarem esta alterações [2]. Os resultados do exame ecocardiográfico (Tabela 1) evidenciaram que a EAo promoveu mudanças estruturais por hipertrofia do VE do tipo concêntrica e elevação da relação do diâmetro do átrio esquerdo pelo peso corporal. Os animais do grupo EAo mostraram melhoria da função sistólica do VE avaliada pela porcentagem de encurtamento do endocárdio e da fração de ejeção. A relação E/A, importante variável para sinalizar a função diastólica, mostrou-se semelhante em comparação ao grupo Sham; entretanto, a elevação do AE/PC conjuntamente a melhoria na função sistólica, indica que a alteração atrial foi consequente à disfunção diastólica ventricular. Os resultados da função sistólica e da estrutura estão de acordo com diversos estudos [2,14,15,24,25,76]. O resultado da relação E/A foi semelhante ao observado por vários autores [14,15,17,25,76]; entretanto, foi divergente de trabalhos que verificaram que essa variável foi menor [2] ou maior [24] nos ratos com 6 semanas de EAo. A discrepância nesta variável pode ser devida à alta frequência cardíaca desses animais, a qual funde as ondas E e A, prejudicando a avaliação da função diastólica.

Após evidenciar que a EAo promoveu remodelação cardíaca, os animais foram alocados em dois novos grupos, isentos de quaisquer diferença estatística em suas variáveis, para dar início aos tratamentos com as rações normolipídica e hiperlipídica (vide Tabela 2).

4.3 – Perfil nutricional dos animais na 18ª semana

Em virtude do estudo ter utilizado ração hiperlipídica, o perfil nutricional dos ratos foi avaliado (Tabela 3). Embora as ingestões alimentares tenham sido menores nos grupos tratados com a dieta hiperlipídica em relação aos tratados com a dieta normolipídica, os animais dos grupos Hiper, apresentaram maior eficiência alimentar, visualizada pelo maior ganho de peso; este dado esta de acordo com dados do nosso grupo, utilizando dieta insaturada [76]. Os ratos do grupo Sham-Hiper, comparando ao Sham-Normo, apresentaram elevação da gordura corporal total e do índice de adiposidade; este dado corrobora com Tomasi et al (2013); entretanto, não houve diferença estatística nestas variáveis nos ratos com EAo, este resultado diverge de estudo que verificou aumento nestas variáveis [76]. Desde que tecido adiposo é resultante do equilíbrio entre ingestão e gasto energético, pode-se inferir que os animais EAo apresentaram menor capacidade de formação do tecido adiposo por menor ingestão e maior gasto energético, este ultimo consequente a ativação neuro-humoral presentes nesses animais. O tratamento dietético não alterou o perfil lipídico e glicêmico sérico dos grupos com EAo e esta de acordo com dados do nosso grupo [76]; houve apenas aumento da glicemia no grupo Sham-Hiper em relação ao Sham-Normo. A elevação da glicemia no grupo Sham-Hiper pode ser explicada pela maior ingestão de lipídeos, o que pode acarretar o aparecimento de resistência à insulina [77,78]. Há ausência de hiperlipidemia pode estar relacionada ao

fato de ambos os grupos possuírem capacidade de estocar os lipídeos no tecido adiposo.

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

Animais submetidos à indução de EAo podem desenvolver disfunção cardíaca e evoluírem para o quadro de insuficiência cardíaca com retenção hídrica. Não houve alteração na porcentagem de umidade dos tecidos cardíacos, pulmonar e hepático entre os dos grupos experimentais, exceto pela diminuição na porcentagem de umidade do tecido hepático no grupo Sham-Hiper em comparação ao Sham-Normo (vide Tabela 4), cujo mecanismo não esta esclarecido. Os dados obtidos estão de acordo com Tomasi et al (2013).

4.5 – Remodelação cardíaca na 18ª semana

4.5.1 – Metabolismo energético miocárdico

A ração hiperlipídica foi empregada para promover elevação do metabolismo energético miocárdico por aumentar a oxidação de ácidos graxos, predominantemente saturados. De acordo com a literatura deveria-se visualizar elevação da via glicolitica e diminuição da via beta-oxidativa no grupo EAo-Normo [30,76]; entretanto, este resultado não foi confirmado, desde que ocorreu queda da via glicolitica e não alteração da via beta-oxidativa (Tabela 5). Com o tratamento das dietas hiperlipídicas esperava-se que no grupo EAo ocorresse diminuição da via glicolítica em consequência da elevação da via beta-oxidativa. No entanto, a enzima PDH mostrou um comportamento inverso ao esperado, isto é, aumentou com a dieta hiperlipídica no grupo EAo, em contraste ao Sham em que mostrou-se diminuida. Em resumo, as alterações metabólicas preconizadas para o grupo EAo, neste

estudo, não ocorreram; nos animais EAo-Hiper, em que hipotetizou-se diminuição da via glicolítica em virtude da elevação da via beta-oxidativa, este fato não aconteceu. Alem disso, o EAo-Normo, não apresentou o comportamento reportado pela literatura. Os resultados obtidos sugerem que os ratos com EAo-Normo não apresentaram deficit de oxigenação, fato que não acarretaria mudança no padrão de utilização dos substratos de glicose e ácidos graxos no miocárdio hipertrofiado. A discussão dos dados obtidos é dificultada em virtude dos trabalhos da literatura terem utilizado modelos experimentais e variáveis metabólicas diferentes às utilizadas no presente estudo [48,50,54,55,57].

4.5.2 – Macroscopia cardíaca

Na 18ª semana foi realizada a avaliação macroscópica cardíaca *post mortem* (Tabela 6), análise que possibilita constatar a existência de alterações estruturais.

Os animais dos grupos EAo apresentaram hipertrofia dos átrios e do VE em relação aos seus respectivos grupos Sham. Estes dados estão a favor dos resultados obtidos no ecocardiograma de seis semanas, comprovando a efetividade na indução da EAo. A EAo acarreta sobrecarga pressórica prolongada ao VE, promovendo remodelação cardíaca caracterizada por hipertrofia do tipo concêntrica com a finalidade de preservação da função sistólica do VE. Fatores mecânicos e bioquímicos agem nos receptores, canais iônicos e integrinas presentes no sarcolema e, sinalizadores bioquímicos citosólicos que promovem elevada síntese de proteínas e na expressão gênica [5,26]. Os dados deste trabalho condizem com artigos publicados por nosso grupo [2,16,17,25,76]. A ração hiperlipídica saturada não promoveu alterações no peso dos tecidos cardíacos do grupo EAo e está de acordo com diversos autores [48,50,52,54,76] e diverge de outros estudos que constataram

atenuação da hipertrofia [53,57,76]. Embora não sendo estatisticamente significativo, um dado que chama atenção neste trabalho, é que o grupo EAo-Hiper apresentou redução na morfologia do coração em relação ao Sham-Hiper.

4.5.3 – Estrutura e função por ecocardiograma

Na 18ª semana foi realizada a análise da estrutura e função cardíaca por exame ecocardiográfico (Tabela 7). O grupo EAo-Normo, em relação ao Sham-Normo, apresentou remodelação estrutural do VE e AE e, não houve alteração da função sistólica e diastólica, esta ultima avaliada pela relação E/A; entretanto, o aumento do AE no grupo EAo revela uma disfunção diastólica desde que o desempenho sistólico foi semelhante entre os grupos. Estes dados corroboram com outros estudos [2,24,76] e diferem de [2], que encontraram disfunção sistólica nos ratos EAo, com 18 semanas; entretanto, Mendes et al (2008) utilizaram dieta comercial contendo 3% de gordura, diferente do presente estudo cuja taxa de lipídeos foi de 6%; esta diferença pode ser a razão da não observação da queda no desempenho cardíaco nesta investigação. A dieta hiperlipídica acarretou queda na variável VEPP, nos animais do grupo EAo-Hiper vs Sham-Hiper, cujo mecanismo precisa ser elucidado. A dieta hiperlipídica, 17% de gordura, não alterou a estrutura e a função sistólica e diastólica dos ratos; a ausência de alteração na sístole pode estar no fato de que não houve, como referido acima, queda deste parâmetro nos ratos EAo-Normo [2].

4.5.4 – Função miocárdica dos músculos papilares isolados

No presente trabalho, a avaliação da função miocárdica foi analisada *in vitro* por meio de músculos papilares isolados do VE. A utilização de músculos papilares com áreas seccionais diferentes poderia ocasionar erros de interpretação, pois há relação inversa entre a sua área e o desenvolvimento de força pelo músculo [79]. Os animais utilizados nos grupos experimentais apresentaram áreas seccionais semelhantes; esta homogeneização nos permite descartar a influência da área seccional sobre os resultados obtidos no estudo.

Na condição basal foi observado elevação na TR entre os animais EAo-Normo e EAo-Hiper em relação aos grupos Sham-Normo e Sham-Hiper, respectivamente (Tabela 8). Esses dados são compatíveis com resultados do nosso grupo que observaram aumento da TR após 6 e 21 semanas de estenose aórtica [16,17]. Os mecanismos responsáveis pela elevação da TR, variável que sinaliza a propriedade viscoelástica da fibra cardíaca, pode ser explicado pela maior deposição de colágeno e/ou alteração no transito de cálcio e/ou déficit energético [74]. As demais variáveis funcionais não sofreram alteração em condição basal nos quatro grupos experimentais.

Nas manobras inotrópicas, foram encontradas alterações em diferentes variáveis funcionais, intergrupos. Em todas as manobras, a TR seguiu o mesmo comportamento da condição basal, isto é, mostrou-se aumentada nos animais EAo em relação aos Sham. As quatro manobras inotrópicas evidenciaram diminuição significativa nos valores da +dT/dt dos grupos EAo vs Sham. Houve diminuição da -dT/dt dos animais EAo vs Sham nas manobras de frequência cardíaca (0,2, 0,8 e 1,0 Hz) e isoproterenol (10^{-7} e 10^{-6} M). O estímulo beta-adrenérgico (10^{-7} e 10^{-6} M) acarretou elevação na TD dos grupos Sham em relação aos EAo. O mecanismo

envolvido na queda da +dT/dt provavelmente está relacionado com a transição da isoforma de alta capacidade ATPásica (α) para a de baixa capacidade ATPásica (β), da miosina de cadeia pesada, que ocorre no coração hipertrofiado [76,80,81]. A redução da -dT/dt estaria relacionada ao aumento da afinidade do cálcio a Troponina C e/ou diminuição da expressão e/ou atividade da SERCA2a, acarretando diminuição na velocidade do processo de recaptura do íon cálcio [76]. A diferença entre os grupos, EAo e Sham, em relação a TD com isoproterenol, é dependente do aumento desta variável no grupo Sham, visto que os animais EAo não se alteraram ao longo da manobra. Este fato mostra que os grupos hipertrofiados apresentam disfunção na via beta-adrenérgica, visto que os animais com EAo apresentaram capacidade de resposta a elevação do cálcio semelhante ao controle. Desde que o isoproterenol promove maior capacidade de captação de cálcio pela SERCA2a, por aumento na fosforilação da fosfolamban, o retículo sarcoplasmático passa a ter maior quantidade de cálcio em seu interior, que será disponibilizada para a próxima contração, resultando em uma maior interação dos filamentos contráteis e consequente aumento na TD; este comportamento foi visualizado nos grupos Sham.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a ração hiperlipídica saturada não promoveu alteração na função miocárdica em condição basal e após as manobras inotrópicas positivas. As alterações na função foram consequentes à presença da estenose aórtica. As alterações observadas foram apenas dependentes dos momentos de avaliação nas diferentes manobras (Tabelas 9-24). Estes resultados corroboram com os resultados *in vivo* no exame ecocardiográfico. Não foram encontrados estudos prévios com metodologia similar, o que impediu a comparação destes resultados com a literatura.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, a hipótese não foi confirmada. A ração hiperlipídica saturada não atenuou a hipertrofia ventricular e não alterou a função cardíaca. Provavelmente, o resultado foi devido ao fato que os ratos com EAo, não apresentaram remodelação de magnitude suficiente para alterar o metabolismo energético e a função do coração.

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;35:562-82.

2) 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(1):62-70.

3) Manuais de Cardiologia. Insuficiência Cardíaca – Remodelamento Cardíaco. Acessado em: 18 de agosto de 2009. Disponível em: www.manuaisdecardiologia.med.br/icc/icc_Page702.htm.

4) Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. Circulation. 2000;102(4):470-9.

5) 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.

6) Kaplan NM. Systemic hypertension: mechanisms and diagnosis. In: Braunwald E, Zipes DP, Libby P. eds. Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine. Philadelphia: Saunders Company. 2001;941-71.

7) Zornoff LAM, Cicogna AC, Paiva SAR, Spadaro J. Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. Rev Soc Cardiol do Estado de São Paulo. 2002;12:371-8.

8) Okoshi MP, Matsubara LS, Franco M, Cicogna AC, Matsubara BB. Myocyte necrosisis is the basis for fibrosis in renovascular hypertensive rats. Braz J Med Biol Res. 1997;30(9):1135-44.

9) Bregagnollo EA, Rodrigues MAM, Montenegro MR, Tucci PJF. Evolução temporal de parâmetros estruturais e funcionais da hipertrofia cardíaca desencadeada em ratos Wistar pela constrição da aorta abdominal. Arq Bras Cardiol. 1986;46(1):9-17.

10) Rossi MA, Peres LC. Effect of captopril on the prevention and regression of myocardial cell hypertrophy and interstitial fibrosis in pressure overload cardiac hypertrophy. Am Heart J. 1992;124(3):700-9.

11) 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(2):253-7.

12) Weinberg EO, Schoen FJ, George D, Kagaya Y, Douglas PS, Litwin SE, *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure with pressure overload hypertrophy due ascending aortic stenosis. Circulation. 1994;90(3):1410-22.

13) Mestrinel MA. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. 2003.

14) Gonçalves G, Zornoff LAM, Ribeiro HB, Okoshi MP, Cordaro FRS, Okoshi K, *et al.* Blockade of renin-angiotensin system attenuates cardiac remodeling in rats undergoing aortic stenosis. Arq Bras Cardiol. 2005;84(4):304-8.

15) 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(3):225-32.

16) 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. 2007;117(1):109-14.

17) Bregagnollo EA, Mestrinel MA, Okoshi K, Carvalho FC, Bregagnollo IF, Padovani CR, *et al*. Relative role of left ventricular geometric remodeling and of morphological and functional myocardial remodeling in the transition from compensated hypertrophy to heart failure in rats with supravalvar aortic stenosis. Arq Bras Cardiol. 2007;88(2):225-33.

18) Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Singh K, Squire R, Okoshi M, *et al*. Direct effects of colchicine on myocardial function. Studies in hypertrophied and failing spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 1999;33(1):60-5.

19) Hirsch AT, Talsnec CE, Schunkert H, Paul M, Dzau VT. Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. Circ Res. 1991;69(2):475-82.

20) Kabour A, Henegar JR, Devineni VR, Janicki JS. Prevention of angiotensin II induced myocyte necrosis and coronary vascular damage by lisinopril and losartan in the rat. Cardiovasc Res. 1995;29(4):543-8.

21) 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(1):383-96.

22) Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Squire R, Okoshi MP, Bing OHL. Role of myocardial contractile status and relaxation in ventricular dysfunction during the transition of heart hypertrophy to failure. Arq Bras Cardiol. 1997;69(6):381-4.

23) Bruckschlegel G, Holmer SR, Jandeleit K, Grimm D, Muders F, Kromer EP, *et al.* Blockade of the renin-angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats. Hypertension. 1995;25(2):250-9.

24) 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(10):2642-54.

25) Ribeiro HB, Okoshi K, Cicogna AC, Bregagnollo EA, Rodrigues MAM, Padovani CR, *et al*. Follow-up study of morphology and cardiac function in rats undergoing induction of supravalvular aortic stenosis. Arq Bras Cardiol. 2003;81(6):569-75.

26) Okoshi K, Ribeiro HB, Okoshi MP, Matsubara BB, Gonçalves G, Barros R, *et al*. Improved systolic ventricular function with normal myocardial mechanics in compensated cardiac hypertrophy. Jpn Heart J. 2004;45(4):647-56.

27) Boluyt MO, Bing OH, Lakatta EG. The ageing spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure. Eur Heart J. 1995;16:19-30.

28) Sugizaki MM, Leopoldo AS, Okoshi MP, Bruno A, Conde SJ, Lima-Leopoldo AP, *et al*. Severe food restriction induces myocardial dysfunction related to SERCA2 activity. Can J Physiol Pharmacol. 2009;87(9):666-73.

29) Korzick DH. Regulation of cardiac excitation-contraction coupling: a cellular update. Adv Physiol Educ. 2003;27(1-4):192-200.

30) Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. Physiol Rev. 2005;85(3):1093-129.

31) An D, Pulinilkunnil 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(1):246-53.

32) 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(3):238-56.

33) Okoshi K, Guimaraes JF, Di Muzio BP, Fernandes AA, Okoshi MP. Diabetic cardiomyopathy. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2007;51(2):160-7.

34) An D, Rodrigues B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;291(4):H1489-506.

35) 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(2):E331-9.

36) 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(3):614-20.

37) Depre C, Vanoverschelde JL, Taegtmeyer H. Glucose for the heart. Circulation. 1999;99(4):578-88.

38) Lopaschuk GD, Folmes CD, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. Circ Res. 2007;101(4):335-47.

39) Nuutila P, Koivisto VA, Knnuti 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;89:1767-74.

40) 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(18):2191-6.

41) Koustsari C, Jensen MD. Thematic review series: patient-oriented research. Free fatty acid metabolism in human obesity. J Lipid Res. 2006;47(8):1643-50.

42) 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(3):417-23.

43) 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(9):2366-74.

44) Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet. 1963;1(7285):785-9.

45) Lopaschuk GD. Targets for modulation of fatty acid oxidation in the heart. Curr Opin Investig Drugs. 2004;5(3):290-4.

46) Nikolaidis LA, Levine TB. Peroxisome proliferator activator receptors (PPAR), insulin resistance, and cardiomyopathy: friends or foe for the diabetic patient with heart failure?. Cardiol Rev. 2004;12(3):158-70.

47) Chess DJ, Stantey WC. Role of diet and fuel overabundance in the development and progression of heart failure. Cardiovasc Res. 2008;79(2):269-78.

48) 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(1):82-8.

49) Mozaffari MS, Patel C, Ballas C, Schaffer SW. Effects of excess salt and fat intake on myocardial function and infarct size in rat. Life Sci. 2006;78(16):1808-13.

50) 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(5):H1585-93.

51) Wilson CR, Tran MK, Salazar KL, Young ME. Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty acid metabolism and contractile dysfunction in the heart of Wistar rats. Biochem J. 2007;406(3):457-67.

52) Rennison JH, McElfresh TA, Okere IC, Vazquez EJ, Patel HV, Foster AB, *et al*. High-fat diet postinfarction enhances mitochondrial function and does not exacerbate left ventricular dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007;292(3):1498-506.

53) Okere IC, Chess DJ, McElfresh TA, Johnson J, Rennison J, Ernsberger P, *et al*. High fat dier prevents cardiac hypertrophy and improves contractile function in the hypertensive dahl salt-sensitive rat. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2005;32(10):825-31.

54) Duda MK, O'Shea KM, Lei B, Barrows BR, Azimzadeh AM, McElfresh TA, *et al*. Dietary supplementation with w-3 PUFAincreases adiponectin and attenuates ventricular remodeling and dysfunction with pressure overload. Cardiovasc Res. 2007;76(2):303-10.

55) Duda MK, O'Shea KM, Lei B, Barrows BR, Azimzadeh AM, McElfresh TA, *et al*. Low-carbohydrate/high fat diet attenuates pressure overload-induced ventricular remodeling and dysfunction. J Card Fail. 2008;14(4):327-35.

56) Okere IC, Chandler MP, McElfresh TA, Renninson JH, sharov V, Sabbah HN, *et al*. Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution and serum leptin. Am J Phisiol Heart Circ physiol. 2006;291(1):H38-44.

57) 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(6):1116-23.

58) Boluyt MO, Robinson KG, Meredith AL, Sem S, Lakatta EG, Crow MT, *et al.* Heart failure after long-term supravalvar aortic constriction in rats. Am J Hypertens. 2005;18(2Pt1):202-12.

59) 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):968-74.

60) Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Carvalho RF, Nogueira CR, Nascimento AF, *et al*. Obesity induces upregulation of genes involved in myocardial Ca2+ handling. Braz J Med Biol Res. 2008;41(7):615-20.

61) Boustany CM, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. AT1-receptor antagonisn reverses the blood pressure elevated associated with diet-induced obesity. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005;289(1):R181-6.

62) Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebekk A. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. J Appl Physiol. 2000;89(4):1445-54.

63) Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000;279(4):H1534-9.

64) Ono K, Masuyama T, Yamamoto K, Doi R, Sakata Y, Nishikawa N, *et al*. Echo doppler assessment of left ventricular function in rats with hypertensive hypertrophy. J Am Soc Echocardiogr. 2002;15(2):109-17.

65) Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman HA, Peterson KL, Gott-shall KR, *et al*. Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. Circulation. 1996;94(5):1109-17.

66) Cantor EJF, Babick AP, Vasanji Z, Dhalla NS, Netticadan T. A comparative serial echocardiographic analysis of cardiac structure and function in rats subjected to pressure or volume overload. J Mol Cel Cardiol. 2005;38(5):777-86.

67) Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Matsubara BB, et al. Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003;284(6):H2242-6.

68) Diniz YS, Cicogna AC, Padovani CR, Santana LS, Faine LA, Novelli ELB. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. Nutrition. 2004;20(2):230-4.

69) Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Aragon FF, Okoshi MP. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. Am J Med Sci. 2000;320(4):244-8.

70) Krebs HA, Henseleit K. Studies on urea formation in the animal organism. Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1932;210:33-66.

71) Yamato T, Yamasaki S, Misumi Y, Kino M, Obata T, Aomine M. Postrest contraction in the ventricular papillary muscle of spontaneously diabetic WBN/Kob rat. Exp Anim. 2001;50(1):19-31.

72) David JS, Vivien B, Lecarpentier Y, Coriat P, Riou B. Interaction of protamine with alpha-and beta adrenoceptor stimulations in rat myocardium. Anesthesiology. 2001;95(5):1226-33; Erratum in Anesthesiology. 2002;96(2):521.

73) Layland J, Kentish JC. Positive force- and $[Ca^{2+}]i$-frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. Am J Physiol. 1999;276(1Pt2):H9-H18.

74) Cezar MDM. Tese de doutorado, Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. 2013.

75) Johnson RA, Wichern DW. Applied multivariate statistical analysis. 6 ed. New Jersey; Prentice-Hall. 2007;773p.

76) Tomasi LC. Dissertação de mestrado, Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. 2013.

77) Oliveira Junior SA, Dal Pai-Silva M, Martinez PF, Campos DHS, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, *et al*. Differential nutritional, endocrine and cardiovascular profiles in obesity-prone and obesity-resistant rats fed standard and hypercaloric diets. Med Sci Monit. 2010;16(7):BR208-17.

78) Oliveira-Junior AS, Martinez PF, Guizoni DM, Campos DHS, Fernandes T, Oliveira EM, *et al*. AT1 receptor blockade attenuates insulin resistance and myocardial remodeling in rats with diet-induced obesity. PLoS One. 2014;9(1):e86447.

79) Bing OH, Wiegner AW, Brooks WW, Fishbein MC, Pfeffer JM. Papillary muscle structure-function relations in the aging spontaneously hypertensive rat. Clin Exp Hipertens A. 1988;10(1):37-58.

80) Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. Pharmacol Ther. 2010;128(1):191-227.

81) Gupta MP. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. J Mol Cell Cardiol. 2007;43(4):388-403.