

UNESP Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Medicina de Botucatu

**INFLUÊNCIA DO AUMENTO ENERGÉTICO PROVENIENTE DE
DIETA HIPERLIPÍDICA NA DISFUNÇÃO CARDÍACA EM RATOS
COM ESTENOSE AÓRTICA SUPRAVALVAR: PARTICIPAÇÃO
DAS CADEIAS PESADAS DE MIOSINA E DA BOMBA DE
CÁLCIO DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO**

Loreta Casquel De Tomasi

BOTUCATU – 2013

Loreta Casquel De Tomasi

**INFLUÊNCIA DO AUMENTO ENERGÉTICO PROVENIENTE DE DIETA
HIPERLIPÍDICA NA DISFUNÇÃO CARDÍACA EM RATOS COM ESTENOSE
AÓRTICA SUPRAVALVAR: PARTICIPAÇÃO DAS CADEIAS PESADAS DE
MIOSINA E DA BOMBA DE CÁLCIO DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: cardiologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna

BOTUCATU – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

De Tomasi, Loreta Casquel.

Influência do aumento energético proveniente de dieta hiperlipídica na disfunção cardíaca em ratos com estenose aórtica supravalvar : participação das cadeias pesadas de miosina e da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático / Loreta Casquel De Tomasi. – Botucatu : [s.n.], 2013

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

Orientador: Antonio Carlos Cicogna

Capes: 40101002

1. Estenose da válvula aórtica. 2. Rato como animal de laboratório.
3. Metabolismo energético. 4. Sistema cardiovascular – Doenças. 5. Nutrição.

Palavras-chave: Dieta hiperlipídica; Disfunção cardíaca; Estenose aórtica supravalvar; Metabolismo energético; MyHC; Rato; SERCA2a.

Dedicatória

Aos meus pais, Miguel e Carmen, e meu irmão Daniel, por todo o amor e carinho e por sempre confiarem em mim. Vocês são fundamentais na minha vida!

Aos meus avós paternos, Paulo e Carminha, e meus avós maternos, Quinzito e Gerce, pela dedicação e carinho. Vocês são parte do meu crescimento e desenvolvimento moral e intelectual.

À minha madrinha Elisângela por sempre acreditar no meu potencial desde pequena.

Aos meus tios, tias, primos e primas presentes em minha vida, compartilhando momentos de alegrias e angústias.

Ao meu namorado André pelo amor, carinho e compreensão. Sempre me incentivando e mostrando que sou capaz de grandes conquistas.

"A família é a presença essencial, a que nunca o abandona, amo muito vocês."

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna, Professor Emérito do Departamento de Clínica Médica da FMB – UNESP, pela dedicação ao ensino e à pesquisa, e por ter me recebido como sua orientada. Muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Katashi Okoshi, Livre-Docente do Departamento de Clínica Médica da FMB – UNESP, pela pronta disponibilidade em realizar os exames ecocardiográficos nos animais, tornando-o imprescindível para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, Professor Titular do Departamento de Bioestatística do IBB – UNESP, pela assistência estatística.

À Profª. Dra. Ana Angélica H. Fernandes, Professora Assistente do Departamento de Bioquímica do IBB – UNESP, pela realização das análises do metabolismo energético.

Ao Dijon Campos, pela amizade e prontidão em auxiliar na execução deste trabalho desde o início.

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.

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 professores Dr. Katashi Okoshi e Dr. Robson F. Carvalho pelas contribuições e sugestões realizadas no exame de qualificação.

À Lúcia Ely Paiva, pela amizade e por estar sempre pronta para me ajudar nas correções linguísticas deste trabalho.

Aos amigos pesquisadores, Adriana, Aline, André Nascto, Andréia, Beatriz, Bruna, Camila M., Camila R., Carlos, Carol, Caroline, Damiana, Dani T., Dani V., Dijon, Fabiane, Fernanda, Luana, Marcelo, Maria Teresa, Miriane, Paula, Paulinha, Priscila, Regiane, Renata, Ricardo, Rodrigo, Sandro e Silvio, pela maravilhosa convivência.

Às minhas amigas conterrâneas, Danielle, Juliana, Maria Teresa e Paula, pelas viagens diárias à Botucatu e por estarem sempre prontas para me auxiliar em assuntos diversos.

Aos funcionários do Laboratório Experimental, Ângelo, Camila, Corina, Diego, Eduardo, Elenize, Elizete, José Aparecido, José Carlos, DeLalla, Marcelle, Mário, Renata, Rogério e Sueli, pelo auxílio na realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica, Alexandre, Ana Maria, Bruno, Elisângela, Laura, Mario e Renato, pelos auxílios prestados.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, Andrea, Diego, Janete, Lilian, Márcia e Regina, pela competência na atuação dos serviços solicitados.

À FAPESP, pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

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

**"O período de maior ganho em conhecimento e experiência
é o período mais difícil da vida de alguém."**

Dalai Lama

RESUMO

A remodelação cardíaca (RC) ocorre em resposta a determinadas agressões como, por exemplo, sobrecarga pressórica, e pode manifestar-se por alterações de tamanho, forma e função do coração. No modelo de estenose aórtica supraavalvar (EAo) em ratos, estudos ecocardiográficos constataram que, 2 e 6 semanas após indução da EAo, os ratos desenvolvem hipertrofia ventricular esquerda, disfunção diastólica e melhora da função sistólica. Após 12 semanas há disfunção sistólica e perto da 20ª semana aparecem sinais de insuficiência cardíaca. Diversos fatores poderiam contribuir para a disfunção neste modelo experimental, como modificações na expressão proteica da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2a) e das cadeias pesadas de miosina (MyHC), ambas com alta capacidade ATPásica. Na RC patológica ocorre diminuição na beta oxidação de ácidos graxos, podendo acarretar déficit energético para o músculo cardíaco hipertrofiado. O objetivo deste trabalho foi testar a hipótese de que o aumento da oferta energética, proveniente de dieta hiperlipídica, atenua a disfunção diastólica e preserva a função sistólica no modelo de EAo. Os mecanismos envolvidos na preservação ou melhora da função estão relacionados com a diminuição na transição da isoforma V1(α) para V3(β) da MyHC e com o aumento da relação SERCA2a/PLB. Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com 21 dias, separados em dois grupos: controle operado (Sham) e estenose aórtica supraavalvar (EAo). Seis semanas após cirurgia, os animais foram redistribuídos em quatro grupos (n=12/grupo): tratados com dieta normolipídica (EAo-N e Sham-N) ou hiperlipídica (EAo-H e Sham-H) por 12 semanas. O perfil nutricional foi determinado pelas análises de ingestão alimentar e calórica, eficiência alimentar, peso e gordura corporal, índice de adiposidade, glicemia, triacilglicerol e ácidos graxos livres não-esterificados. A RC foi caracterizada pelas análises estrutural e funcional do coração por ecocardiograma na 6ª e 18ª semana, e estudo macroscópico, metabolismo energético e as relações SERCA2a/PLB e β/α MyHC cardíacas *post mortem*. Para comparações entre Sham e EAo, utilizou-se Teste "t" de Student ou Mann-Whitney e, entre EAo-N, Sham-N, EAo-H e Sham-H, utilizou-se ANOVA complementada com Bonferroni ou Kruskal-Wallis complementado com Dunn. O nível de significância foi de 5%. Os resultados ecocardiográficos da 6ª semana mostraram que os animais do grupo EAo apresentaram hipertrofia

concêntrica, melhoria na função sistólica e disfunção diastólica ventricular, evidenciada pelo aumento do átrio esquerdo (AE). No final do experimento, 18ª semana, a ingestão alimentar foi menor nos grupos Sham-H e EAo-H em relação aos grupos Sham-N e EAo-N, respectivamente. A gordura corporal total e o índice de adiposidade foram maiores no grupo EAo-H vs EAo-N. A análise do metabolismo energético cardíaco mostrou aumento da atividade da ATP sintetase nos grupos EAo-N e EAo-H vs Sham-N e Sham-H, respectivamente. O peso do ventrículo esquerdo (VE) e do átrio (AT) e as relações VE/tíbia e AT/tíbia foram maiores nos grupos EAo-N e EAo-H vs Sham-N e Sham-H, respectivamente. Adicionalmente, o peso do AT e a relação AT/tíbia foi menor no grupo EAo-H vs EAo-N. Os dados ecocardiográficos mostraram que os grupos EAo-N e EAo-H apresentaram fração de ejeção, %Enc. Endo, Esp. rel. VE, índice MVE, AE e AE/PC, aumentados em comparação aos grupos Sham-N e Sham-H, respectivamente. A relação AE/AO foi maior no grupo EAo-N vs Sham-N. A relação AE/PC foi menor no grupo EAo-H vs EAo-N; o diâmetro do AE ($p=0,10$) e a relação AE/AO ($p<0,06$) tenderam a ser menor no grupo EAo-H vs EAo-N, sugerindo atenuação da disfunção diastólica nos animais EAo-H. A razão β/α MyHC foi maior nos animais EAo-N e EAo-H em relação aos animais Sham-N e Sham-H, respectivamente. A relação SERCA2a/PLB foi menor nos grupos EAo-N e EAo-H vs Sham-N e Sham-H, respectivamente. A relação pPLB Ser16/PLB foi maior no grupo EAo-N em relação aos grupos Sham-N e EAo-H. Em conclusão, a hipótese foi parcialmente confirmada; a dieta hiperlipídica atenuou a disfunção diastólica, evidenciada pela diminuição da hipertrofia atrial, e preservou a função sistólica no grupo EAo-H. Entretanto, nesse processo, não houve participação das proteínas com alta capacidade ATPásica, como a MyHC e a SERCA2a, sugerindo que a dieta hiperlipídica não acarretou aumento energético miocárdico.

Palavras-chave: dieta hiperlipídica, disfunção cardíaca, estenose aórtica supralvalvar, metabolismo energético, MyHC, rato, SERCA2a

ABSTRACT

Cardiac remodeling (CR) occurs in response to some cardiac injuries, such as pressure overload, and it may be manifested as changes in size, shape and function of the heart. In the model of supraaortic stenosis (SVAS), echocardiographic studies performed in our laboratory showed that, 2 and 6 weeks post SVAS induction, rats developed left ventricular hypertrophy, diastolic dysfunction and improved systolic function. After 12 weeks there is systolic dysfunction and around the 20th week signs of heart failure appear. Several factors could contribute to the dysfunction in this experimental model, such as changes in protein expression of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA2a) and myosin heavy chain (MyHC), both with high ATPase capacity. Pathological CR is underscored by a reduction in fatty acid beta oxidation, which may cause energy deficit to the hypertrophied cardiac muscle. The aim of this work was to test the hypothesis that increased energy supply, derived from high-fat diet, attenuates cardiac dysfunction in the SVAS model. The mechanisms involved in the attenuation of dysfunction are related to decreased V1(α) to V3(β) MyHC isoform transition and increased SERCA2a/PLB ratio. Male *Wistar* rats, aged 21 days, were separated into two groups: operated control (Sham) and supraaortic stenosis (SVAS). Six weeks after surgery, the animals were redistributed into four groups (n=12/group): fed with normolipidic diet (Sham-N and SVAS-N) or high-fat diet (Sham-H and SVAS-H). The nutritional profile was determined by food and calorie intake, feed efficiency, weight and body fat, adiposity index, blood glucose, triacylglycerol and non-esterified free fatty acid. The CR was characterized by analyses of the cardiac structure and function by echocardiogram in the 6th and 18th week, macroscopic study, energy metabolism and SERCA2a/PLB and β/α MyHC cardiac ratios. For comparisons between Sham and SVAS we used Student "t" test or Mann-Whitney, and for comparisons among Sham-N, SVAS-N, Sham-H and SVAS-H we used either ANOVA supplemented with Bonferroni or Kruskal-Wallis supplemented with Dunn. The significance level was 5%. The echocardiographic results in the 6th week showed that SVAS group had concentric hypertrophy, improved systolic function and diastolic dysfunction, evidenced by increased left atrium (LA). At the end of the experiment, 18th week, food intake was lower in groups Sham-H and SVAS-H compared to Sham-N and SVAS-N, respectively. Total body fat and adiposity index were higher in SVAS-H vs SVAS-N.

The analysis of cardiac energy metabolism showed increased ATP synthase activity in groups SVAS-N and SVAS-H vs Sham-N and Sham-H, respectively. Left ventricle (LV) and atrium (AT) weights and LV/tibia and AT/tibia ratios were higher in groups SVAS-N and SVAS-H vs Sham-N and Sham-H, respectively. Additionally, AT weight and AT/tibia ratio were lower in SVAS-H vs SVAS-N. The echocardiographic data in the 18th week showed that groups SVAS-N and SVAS-H had increased ejection fraction, % ES, RWT, LVM index, LA and LA/BW compared to Sham-N and Sham-H, respectively. LA/AO ratio was higher in the SVAS-N than in Sham-N. LA/BW ratio was lower in SVAS-H vs SVAS-N; LA diameter ($p=0.10$) and LA/AO ratio ($p<0.06$) tended to be lower in group SVAS-H vs SVAS-N, suggesting attenuation of the diastolic dysfunction in SVAS-H animals. β/α MyHC ratio was greater in SVAS-N and SVAS-H animals compared to Sham-N and Sham-H, respectively. SERCA2a/PLB ratio was lower in SVAS-N and SVAS-H vs Sham-N and Sham-H, respectively. The pPLBSer16/PLB ratio was higher in SVAS-N group than in Sham-N and SVAS-H groups. In conclusion, the hypothesis was partially confirmed; the high-fat diet attenuated diastolic dysfunction, evidenced by decreased atrial hypertrophy, and it preserved systolic function in SVAS-H group. However, high ATPase capacity proteins, such as SERCA2a and MyHC, did not take part in this process, suggesting that the high-fat diet did not increase myocardial energy.

Keywords: cardiac dysfunction, energy metabolism, high-fat diet, supralvalvar aortic stenosis, MyHC, rat, SERCA2a

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição de macro e micronutrientes das rações.....	24
Tabela 2. Dados ecocardiográficos dos grupos Sham e EAo na 6ª semana.....	36
Tabela 3. Dados ecocardiográficos dos grupos EAo-N e EAo-H na 6ª semana...	37
Tabela 4. Perfil nutricional dos animais.....	38
Tabela 5. Porcentagem (%) de umidade nos tecidos.....	39
Tabela 6. Metabolismo energético cardíaco.....	40
Tabela 7. Análise macroscópica cardíaca <i>post mortem</i>	41
Tabela 8. Dados ecocardiográficos dos grupos na 18ª semana.....	42
Tabela 9. Razão β/α das isoformas de cadeia pesada de miosina (MyHC).....	43

Lista de figuras

Figura 1. Delineamento experimental.....	23
Figura 2. Expressão proteica da SERCA2a.....	44
Figura 3. Expressão proteica da PLB.....	44
Figura 4. Expressão proteica da pPLB Ser16.....	45
Figura 5. Expressão proteica da pPLB Thr17.....	45
Figura 6. Relação SERCA2a/PLB.....	46
Figura 7. Relação pPLB Ser16/PLB.....	47
Figura 8. Relação pPLB Thr17/PLB.....	47

SUMÁRIO

Lista de tabelas

Lista de figuras

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1- Animais.....	22
2.2- Protocolo experimental.....	22
2.3- Composição das rações normolipídica e hiperlipídica.....	23
2.4- Indução de estenose aórtica supravalvar.....	24
2.5- Análise do perfil nutricional.....	25
2.6- Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático.....	26
2.7- Caracterização da remodelação cardíaca.....	26
2.7.1- Análise estrutural e funcional do coração por ecocardiograma.....	26
2.7.2- Análise macroscópica do coração <i>post mortem</i>	28
2.7.3- Análise do metabolismo energético miocárdico.....	28
2.7.3.1- Obtenção das amostras.....	29
2.7.3.2- Quantificação das enzimas reguladoras.....	29
2.7.4- Análise molecular do coração.....	30
2.7.4.1- Extração das proteínas miocárdicas.....	30
2.7.4.2- Análise das isoformas de cadeia pesada de miosina.....	31
2.7.4.3- Expressão das proteínas do trânsito de cálcio.....	31
2.8- Análise estatística.....	34
3. RESULTADOS	35
3.1- Caracterização ecocardiográfica dos grupos Sham e EAo na 6ª semana.....	36
3.2- Perfil nutricional.....	37
3.3- Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático.....	39
3.4- Caracterização da remodelação cardíaca na 18ª semana.....	39
3.4.1- Quantificação das enzimas reguladoras do metabolismo energético.....	39
3.4.2- Análise macroscópica do coração <i>post mortem</i>	40
3.4.3- Análise estrutural e funcional do coração por ecocardiograma.....	41

3.4.4- Análise das isoformas de cadeia pesada de miosina.....	43
3.4.5- Expressão das proteínas do trânsito de cálcio.....	43
4. DISCUSSÃO.....	48
4.1- Dietas hiperlipídicas.....	49
4.2- Estrutura e função por ecocardiograma na 6ª semana.....	49
4.3- Perfil nutricional dos animais na 18ª semana.....	50
4.4- Remodelação cardíaca na 18ª semana.....	51
4.4.1- Metabolismo energético miocárdico.....	51
4.4.2- Macroscopia cardíaca <i>post mortem</i>	52
4.4.3- Estrutura e função por ecocardiograma.....	53
4.4.4- Isoformas de cadeia pesada de miosina.....	54
4.4.5- Expressão das proteínas do trânsito de cálcio.....	55
5. CONCLUSÃO.....	57
6. REFERÊNCIAS.....	59

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A remodelação cardíaca (RC) pode ser definida como alterações na expressão gênica, moleculares, celulares ou intersticiais que podem manifestar-se clinicamente por mudanças de tamanho, forma e função do coração em resposta a determinadas agressões como, por exemplo, isquemia, inflamação, alterações genéticas, e sobrecarga volumétrica ou pressórica⁽¹⁻⁴⁾. 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 insuficiência cardíaca⁽⁵⁻⁷⁾.

Existem diversos modelos experimentais para o estudo da RC por sobrecarga pressórica⁽⁸⁻²⁷⁾. Mais recentemente, o modelo de estenose aórtica supraavalvar (EAo) tem sido utilizado para promover o desenvolvimento gradual de hipertrofia ventricular esquerda em ratos jovens^(2,12-17,23-24); inicialmente a sobrecarga pressórica é leve, acentuando-se progressivamente à medida que os animais crescem. Em nosso laboratório, por estudo ecocardiográfico, constatou-se que após 2 e 6 semanas da indução da EAo, os ratos desenvolvem hipertrofia ventricular esquerda⁽²⁵⁾, disfunção diastólica e melhoria da função sistólica⁽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⁾.

Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela depressão da função cardíaca não estão totalmente esclarecidos. Diversos fatores poderiam contribuir para a disfunção no modelo experimental de EAo como, por exemplo, modificações na expressão das proteínas reguladoras do trânsito de cálcio (Ca^{+2}) e das proteínas contráteis, especificamente a bomba de recaptura do Ca^{+2} para o retículo

sarcoplasmático (SERCA2a) e a cadeia pesada de miosina (MyHC), ambas com alta capacidade ATPásica^(1,4,5,27-29).

A **contração** cardíaca se inicia quando um estímulo despolarizador atinge o canal de Ca^{+2} do tipo L sarcolemal (Canal L), que se abre permitindo a entrada de pequenas quantidades de Ca^{+2} para dentro do sarcoplasma. Essa entrada de Ca^{+2} induz à rápida liberação de grande quantidade de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático (RS) através do receptor de rianodina (RyR). O aumento do Ca^{+2} citosólico possibilita a ligação desse íon com a troponina C (TnC), promovendo uma alteração conformacional no complexo tropomiosina, permitindo a interação entre a actina e a cabeça da miosina⁽³⁰⁻³²⁾. No miocárdio, três isoformas de MyHC são expressas diferindo em sua composição: $\alpha\alpha$ em V1, $\alpha\beta$ em V2 e $\beta\beta$ em V3. A isoforma V1, conhecida como a isoforma “rápida” do coração, hidrolisa a adenosina trifosfato (ATP) de 3 a 7 vezes mais rapidamente do que a isoforma V3, conhecida como a isoforma “lenta”⁽³³⁻³⁵⁾. O **relaxamento** ocorre quando a MyHC utiliza a molécula de ATP para se desacoplar da actina, e quando 60-80% do Ca^{+2} citosólico é recapturado para dentro do RS através da SERCA2a. A função da SERCA2a é regulada pela fosfolambam (PLB) que, em seu estado fosforilado, na serina 16 (pPLB Ser16) via adenosina monofosfato cíclico (AMPc), ou na treonina 17 (pPLB Thr17) via quinase dependente de Ca^{+2} -calmodulina, permite a recaptura do Ca^{+2} pela SERCA2a para dentro do RS⁽³⁶⁻³⁸⁾. O restante do Ca^{+2} intracelular (20-40%) é removido para o meio extracelular através do trocador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ (NCX) e da bomba de cálcio da membrana plasmática (PMCA), garantindo dessa forma a homeostase de Ca^{+2} intracelular⁽³⁰⁻³²⁾.

Em modelos de hipertrofia induzida por sobrecarga pressórica ocorre aumento da isoforma V3 em relação a V1, e diminuição na expressão e na atividade

da SERCA2a^(28,29,35-41). Essa alteração na expressão da SERCA2a está associada à redução ou à inexistência de alteração na expressão da PLB, resultando na queda da relação SERCA2a/PLB. O nível de fosforilação da PLB é um fator importante na modulação da atividade da SERCA2a durante o processo de remodelação cardíaca⁽³⁷⁻⁴⁰⁾. Essas alterações nas proteínas miocárdicas com capacidade ATPásica, como a MyHC e a SERCA2a, contribuem significativamente para o comprometimento da função mecânica normalmente observado na hipertrofia patológica^(34,39).

No coração adulto, cerca de 60-70% do ATP utilizado no processo de contração e relaxamento é normalmente obtido a partir da beta oxidação de ácidos graxos, e os outros 30-40% provêm da via glicolítica⁽⁴²⁻⁴⁷⁾. Como o miocárdio não sintetiza ácidos graxos, a utilização desse 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^(42,43,48,49). Estudos clínicos e experimentais têm mostrado que o fator responsável pela escolha do substrato energético cardíaco são os níveis plasmáticos elevados de ácidos graxos e triglicérides^(42,43,46,50-55). O aumento dos níveis de ácidos graxos inibe a glicólise no citosol e a ação da enzima piruvato desidrogenase na mitocôndria^(51,56). Entretanto, quando os níveis plasmáticos de ácidos graxos são baixos e as concentrações de glicose e de insulina são altas, como no estado pós-prandial, a glicose se torna o principal substrato para o metabolismo oxidativo do coração^(42,43,49).

No processo de RC patológica, ocorre uma mudança no padrão de utilização do substrato energético miocárdico evidenciado pelo aumento da captação e utilização de glicose, porém sem aumento proporcional na oxidação mitocondrial

desse substrato. Em adição, ocorre diminuição na beta oxidação de ácidos graxos por redução da atividade de enzimas mitocondriais envolvidas na oxidação dos ácidos graxos⁽⁵⁷⁻⁶⁰⁾. Essa redução associada à maior necessidade energética miocárdica, decorrente do aumento das miofibrilas contráteis dos sarcômeros, poderá acarretar um déficit energético relativo, isto é, menor quantidade de ATP em relação às necessidades do músculo cardíaco hipertrofiado.

Como o déficit energético contribui para a ocorrência da disfunção cardíaca⁽⁶¹⁾, vários estudos procuraram analisar o efeito do aumento na oferta de energia por suplementação com ácidos graxos no processo de RC patológica por sobrecarga pressórica⁽⁶²⁻⁷¹⁾. Os resultados são contraditórios, visto que os autores ou não encontraram alteração⁽⁶²⁻⁶⁶⁾ ou verificaram atenuação da RC⁽⁶⁷⁻⁷¹⁾. Os trabalhos que avaliaram a influência do aumento do teor de ácidos graxos insaturados na dieta em camundongos com EAo supraavalvar por um período de 6 semanas, ou em ratos com EAo abdominal por um período de 9 semanas, constataram, respectivamente, que a dieta não alterou⁽⁶⁴⁾ ou a dieta atenuou⁽⁶⁹⁾ o remodelamento e a disfunção cardíaca do VE. Esses autores iniciaram o tratamento dietético concomitante ao processo cirúrgico.

Nos trabalhos que constataram atenuação da hipertrofia e melhoria da função, os autores não associaram essas mudanças à restauração do metabolismo energético miocárdico⁽⁶⁷⁻⁷¹⁾. Chess e Stanley, revisando o papel dos substratos energéticos sobre o desenvolvimento e a progressão da insuficiência cardíaca, sugerem que essa síndrome pode ser prevenida ou retardada por dieta pobre em níveis glicêmicos e rica em ácidos graxos mono e poli insaturados⁽⁶¹⁾.

Não foram encontrados estudos que avaliaram a influência da maior oferta energética por lipídeos insaturados para o miocárdio após o estabelecimento da

remodelação patológica. A hipótese deste trabalho é de que o aumento da oferta energética, proveniente de dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos insaturados, atenua a disfunção diastólica e preserva a função sistólica no modelo de EAo. Os mecanismos envolvidos na preservação ou melhoria da função estão relacionados com a diminuição na transição da isoforma V1(α) para V3(β) da MyHC e com o aumento da relação SERCA2a/PLB. Essas proteínas miocárdicas com capacidade ATPásica, isto é, aquelas que necessitam de ATP para o seu funcionamento, apresentam deterioração do seu funcionamento em decorrência do déficit energético que pode ocorrer no processo hipertrófico. Portanto, com o objetivo de testar essa hipótese, ratos com EAo, com disfunção diastólica e com melhoria da função sistólica foram tratados com dieta hiperlipídica insaturada.

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Animais

No presente estudo foram utilizados ratos *Wistar* machos, com 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, São Paulo, Brasil. Os animais foram mantidos nas seguintes condições: gaiolas individuais de polipropileno com tampas de arame cromado forradas com maravalha de *Pinus* esterilizada; temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade controlada ($55 \pm 5^\circ\text{C}$) 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*” publicado pela *U.S. National Institutes of Health* e aprovados pela “Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP” (protocolo CEEA 850-2010).

2.2 – Protocolo Experimental

Foram formados dois grupos experimentais: controle operado (Sham) e estenose aórtica supravalvar (EAo). Após 6 semanas do procedimento cirúrgico, os animais do grupo Sham e os do grupo EAo foram distribuídos em dois novos grupos: tratados com dieta normolipídica insaturada (EAo-N, n=12 e Sham-N, n=12) ou com dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos insaturados (EAo-H, n=12 e Sham-H, n=12) (Figura 1). As dietas hiperlipídicas foram administradas após 6 semanas de EAo, pois trabalhos anteriores mostraram que esses animais apresentam hipertrofia ventricular esquerda, disfunção diastólica e melhoria da função sistólica do ventrículo esquerdo^(2,17,25).

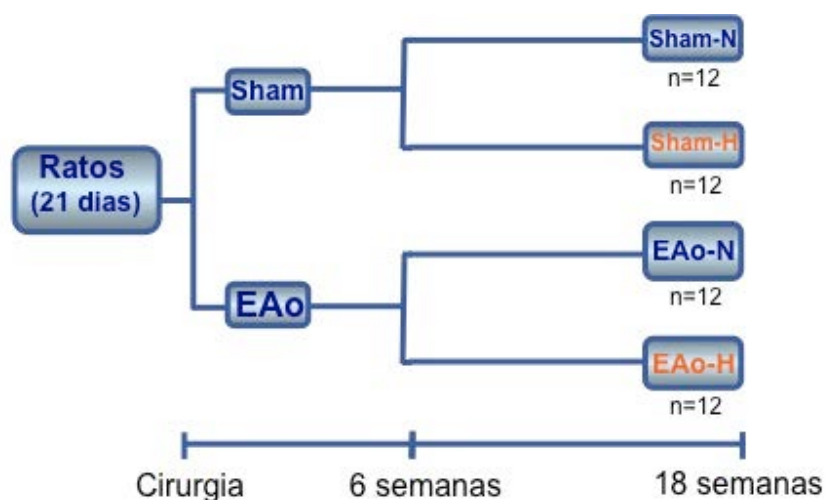


Figura 1. Delineamento experimental

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^(2,25,72). Foram excluídos do protocolo experimental os animais que apresentaram sinais de insuficiência cardíaca como taquipnéia associada a um dos seguintes sinais: edema, ascite, derrame pleuro-pericárdico e trombo em átrio esquerdo⁽¹⁸⁾.

2.3 – Composição das rações normolipídica 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, porém com a mesma quantidade de carboidratos. O modelo dietético foi uma adaptação de trabalhos anteriores publicados por nosso grupo^(73,74).

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 normolipídica e hiperlipídica está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição de macro e micronutrientes das rações

Componentes	Rações	
	Normolipídica	Hiperlipídica
Proteína (%)	24	18
Carboidrato (%)	40	40
Gordura (%)	6	17
Fibras (%)	12	9
Outros* (%)	18	16
Ácidos graxos insaturados (%)	69	69
Ácidos graxos saturados (%)	31	31
Calorias (Kcal/g)	2,93	3,64

* Outros: umidade, vitaminas e minerais.

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 e pesando de 70 a 90 g, após anestesia com cloridrato de ketamina (60 mg/kg) e cloridrato de xilidino (10 mg/kg) intraperitoneal, foram submetidos à toracotomia mediana. A aorta ascendente foi dissecada e um clipe de prata, com 0,6 mm de diâmetro interno, 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 receberam intraperitonealmente 1 ml de soro

fisiológico aquecido e foram ventilados manualmente com pressão positiva e oxigênio a 100%. Concluído o ato cirúrgico, os ratos foram colocados em superfície aquecida até retornarem da anestesia. Os animais do grupo Sham foram submetidos à mesma cirurgia, mas sem a colocação do clipe.

2.5 – Análise do perfil nutricional

O perfil nutricional foi determinado pela análise de ingestão calórica, eficiência alimentar, peso e gordura corporal, índice de adiposidade, glicemia, triacilglicerol e ácidos graxos livres não-esterificados (NEFA). A ingestão calórica foi calculada pela seguinte fórmula: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor energético de cada dieta (g x kcal). A eficiência alimentar, que analisa a capacidade do animal de converter a energia alimentar consumida em peso corporal, foi calculada dividindo-se o ganho total de peso dos animais (g) pela energia total ingerida (Kcal). Como os animais alimentados com dieta hiperlipídica podem desenvolver aumento na taxa de gordura corporal, o índice de adiposidade foi avaliado nos grupos experimentais. Após a eutanásia, foram coletados os depósitos de gordura epididimal, visceral e retroperitoneal dos animais. A partir da soma dos depósitos normalizada pelo peso corporal $[(\text{epididimal} + \text{retroperitoneal} + \text{visceral}) / \text{peso corporal} \times 100]$ calculou-se o índice de adiposidade, adaptado de Boustany et al 2005⁽⁷⁵⁾. Para análise do perfil lipídico os ratos foram colocados em jejum por 12 a 15 horas, anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg/ip) e eutanasiados por decapitação. A seguir, as amostras de sangue foram coletadas em tubos Falcon, centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e armazenadas em freezer à -80°C. A concentração plasmática de triacilglicerol foi analisada com kit específico (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil) pelo método enzimático colorimétrico automatizado (Chemistry Analyzer BS-200, Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China). Os níveis de NEFA

plasmáticos foram avaliados com kit (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) pelo método enzimático colorimétrico e leitura em leitor de microplaca (Spectra MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Para a análise da glicemia basal os animais foram expostos a jejum e anestesia, vide acima, e as coletas de sangue foram realizadas na artéria caudal; os níveis glicêmicos foram avaliados com glicosímetro portátil Accu-Chek Go Kit (Roche Diagnostics Brazil Ltda, São Paulo, Brazil).

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

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

2.7 – Caracterização da remodelação cardíaca

2.7.1 – Análise estrutural e funcional do coração por ecocardiograma

A análise estrutural e funcional cardíaca foi realizada *in vivo* por meio do ecocardiograma. A análise ecocardiográfica foi realizada após 6 e 18 semanas da indução de EAO. O estudo após 6 semanas teve como finalidade caracterizar, estrutural e funcionalmente, os ratos, a fim de formar dois grupos homogêneos com EAO: EAO-N e EAO-H. O ecocardiograma representa uma alternativa para o estudo da função ventricular e pode oferecer importantes informações sobre desempenho cardíaco em roedores⁽⁷⁶⁾. 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⁽⁷⁷⁾; e 3) os efeitos de diferentes intervenções sobre o coração⁽¹⁵⁾. É um método versátil, seguro, indolor, não invasivo e importante para análises seriadas⁽⁷⁸⁾. É um procedimento que causa menos alterações fisiológicas cardíacas do que técnicas invasivas, como a hemodinâmica⁽⁷⁹⁾. É amplamente aceito e utilizado para a determinação da massa do ventrículo esquerdo, embora possa superestimar os valores determinados pós-sacrifício⁽⁸⁰⁾.

Para a realização do exame, os ratos foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip) e posicionados em decúbito lateral esquerdo. Utilizou-se o ecocardiógrafo modelo Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Tirat Carmel, Israel), equipado com transdutor eletrônico de 12 MHz. Para medir as estruturas cardíacas, foram utilizadas imagens em modo-M com o feixe de ultra-som orientado pela imagem bidimensional com o transdutor na posição paraesternal eixo menor. A imagem monodimensional do ventrículo esquerdo (VE) foi obtida posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares⁽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 interventricular (EDSIV) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do VE (DSVE) e a espessura sistólica da parede posterior do VE (ESPP) e septo interventricular (ESSIV) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro mínimo da cavidade. Para avaliar a função sistólica do VE, foram

calculadas a porcentagem de encurtamento endocárdico (% Enc. Endo), $[(DDVE - DSVE) / DDVE \times 100]$, 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⁽⁸¹⁾.

2.7.2 – Análise macroscópica do coração *post mortem*

A análise macroscópica *post mortem* permite identificar a presença de hipertrofia atrial e ventricular e foi realizada somente 18 semanas após a indução da EAo. Os animais foram submetidos à anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/kg/ip) e eutanasiados por decapitação. O coração dos animais foi removido e dissecado. Para indicar o grau de hipertrofia cardíaca foram avaliados o peso dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) e o peso dos átrios (AT). Também foram analisadas as relações VE, VD e AT pelo comprimento da tíbia, obtendo as seguintes relações: VE/tíbia, VD/tíbia e AT/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; citrato sintase (CS, E.C. 4.1.3.7), reguladora do fluxo de metabólitos através do Ciclo de Krebs e marcadora do metabolismo aeróbico⁽⁸²⁾ e ATP sintetase (E.C. 3.6.3.14), enzima final da fosforilação oxidativa.

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°C, sendo os sobrenadantes utilizados para as determinações de proteínas totais e enzimas reguladoras das vias metabólicas. A atividade da ATP sintetase foi determinada após ressuspensão do precipitado com tampão fosfato de sódio 0,1 M contendo 250 mM de sacarose e 2 mM de EDTA, e centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos.

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), MgCl₂, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, aldolase, trifosfato isomerase, ATP e frutose-6-fosfato, com medidas da velocidade de oxidação do NADH₂. 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, ditioneitol, MgCl₂, NBT, piruvato de sódio e fenazina metasulfato, onde se mediu a conversão do piruvato em acetil-CoA através da velocidade de 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. A quantificação da CS foi em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo acetil-CoA 0,1 mM, ditioneitol-2-

nitrobenzoato (DTNB) e oxaloacetato 0,5 mM. A atividade da ATP sintetase foi determinada em meio tamponado (Tris-HCl 50 mM; pH 8,0), na presença de MgCl₂, NADH, fosfoenolpiruvato, ATP, LDH e piruvato quinase. Os reagentes utilizados foram da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). As atividades enzimáticas foram determinadas com a utilização do leitor de microplacas μ Quant 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 molecular do coração

A avaliação molecular da expressão proteica das isoformas de cadeia pesada de miosina e das proteínas envolvidas no trânsito de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (RS) foi realizada no VE, pelas técnicas de eletroforese e de *Western Blot* respectivamente.

2.7.4.1 – Extração das proteínas miocárdicas

Fragmentos do ventrículo esquerdo foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C. A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmington, USA) com tampão fosfato (fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, sacarose 0,3 M, DTT 0,5 mM, EDTA 1 mM pH 8,0, PMSF 0,3 mM, NaF 10 mM e coquetéis inibidores de protease e fosfatase) para a análise das isoformas de cadeia pesada de miosina e com tampão RIPA (Tris HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, NP-40 1%, desoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e coquetéis inibidores de protease e fosfatase) para as análises por *Western Blot*. O processo foi realizado três vezes durante 10 segundos a 4°C, com intervalos de 20 segundos. O produto da homogeneização foi

centrifugado (Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany) a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para tubos *eppendorfs* e armazenado em freezer a -80°C. A concentração de proteína foi analisada pelo método de Bradford⁽⁸³⁾, utilizando as curvas de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

2.7.4.2 – Análise das isoformas de cadeia pesada de miosina (MyHC)

Após a extração das proteínas, item 2.7.4.1, a separação das isoformas de MyHC do miocárdio foi realizada através de eletroforese em gel de poliácridamida duodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)^(84,85). Foi procedida a eletroforese com 12 ug de proteína total, em gel de resolução a 8% e gel de empacotamento a 4%, durante 40 horas de corrida a 100 V e, em seguida, corado com Coomassie Blue. Por fim, as isoformas de MyHC foram identificadas de acordo com seus pesos moleculares e a porcentagem relativa de cada tipo foi quantificada por densitometria.

2.7.4.3 – Expressão das proteínas do trânsito de cálcio

A expressão das proteínas do trânsito de cálcio foi realizada pela técnica de *Western Blot*, que é um método frequentemente utilizado em pesquisas para detectar proteínas em um homogenato de tecido biológico^(86,87). O método compreende as seguintes etapas: extração de proteínas, eletroforese em gel, transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose, identificação das proteínas por anticorpos específicos e quantificação dos *blots* de polipetídeos.

Neste trabalho foi realizada a expressão das seguintes proteínas: SERCA2a, PLB, pPLB Ser16 e pPLB Thr17. Além disso, foi analisada a expressão da proteína de normalização, a β -actina.

Após a extração e quantificação da concentração protéica, item 2.7.4.1, as amostras cardíacas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris-HCl 240 mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200 mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris-HCl 240 mM pH 6,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCl 240 mM pH 8,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed). A concentração do gel de resolução variou entre 6 a 15%, dependendo do peso molecular da proteína analisada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) para identificação do tamanho das bandas. A corrida eletroforética foi efetuada a 120V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por um período variável de acordo com o tamanho da proteína, em média 1h30 minutos, com tampão de corrida (Tris 0,25 M, glicina 192 mM e SDS 1%).

Após corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando-se sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) contendo tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Após a transferência os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução bloqueadora a 0,5% de leite em pó desnatado Molico® (Nestlé Brasil, Araçatuba, SP, Brasil), dissolvido em tampão TBS-T (Tris 10 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM e Tween 20 0,1%) por 120 minutos à temperatura ambiente (24°C) sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-T (Tris 10 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM e Tween 20 0,1%) e incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora, sob agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o

anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-T e incubada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído na solução bloqueadora, por 2 horas sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-T. A imuno-deteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA). Finalmente, as membranas foram analisadas em fotodocumentador Gel Logic 6000 Pro (Carestream Health, Rochester, NY, USA) e as análises quantitativas das bandas protéicas (*blots*) foram realizadas pelo software *Carestream Molecular Imaging 5.0* (Carestream Health, Rochester, NY, USA).

Anticorpos primários:

- *SERCA2 ATPase, mouse IgG1* (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1: 2500.
- *Phospholamban, rabbit IgG* (Abcam, Cambridge, MA, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:5000.
- *Phospho-Phospholamban (Ser16), rabbit IgG* (Badrilla, Leeds, West Yorkshire, UK). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:5000.
- *Phospho-Phospholamban (Thr17), rabbit IgG* (Badrilla, Leeds, West Yorkshire, UK). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:5000.
- *β -Actin, rabbit IgG* (Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:1000.

Anticorpos secundários:

- Os anticorpos secundários anti-rabbit IgG-HRP ab97069 e anti-mouse IgG-HRP ab98808 (Abcam, Cambridge, MA, USA) foram utilizados na titulação de 1:5000-1:10000.

2.8 – Análise estatística

Os dados foram expressos por meio de medidas descritivas de posição e variabilidade. A comparação entre os grupos Sham e EAo na 6ª semana pós-indução da EAo foi realizada pelo teste "t" de Student ou Mann-Whitney para amostras independentes. As comparações entre os grupos no final do experimento, 18ª semana, foram realizadas pela técnica de análise de variância (ANOVA) para esquema de dois fatores no experimento completamente casualizado (quando não-paramétrico, Kruskal-Wallis) complementada com teste de comparações múltiplas de Bonferroni (quando não-paramétrico, Dunn)⁽⁸⁸⁾. As conclusões estatísticas foram discutidas ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

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

Os dados ecocardiográficos dos grupos Sham e EAo obtidos na 6ª semana estão apresentados na Tabela 2. Os animais do grupo EAo apresentaram fração de ejeção, %Enc. Endo, esp. rel. VE, índice MVE, AE, AE/AO e AE/PC aumentados em relação ao grupo Sham.

Tabela 2. Dados ecocardiográficos dos grupos Sham e EAo na 6ª semana

Variáveis	Grupos	
	Sham (n=8)	EAo (n=24)
FC (bpm)	321 ± 68	300 ± 31
Fração ejeção	0,91 ± 0,02	0,97 ± 0,02 *
% Enc. Endo	54,8 ± 2,6	71,2 ± 6,6 *
VEPP (mm/s)	37,9 ± 3,8	33,9 ± 6,9
E/A [#]	1,52 (1,42; 2,21)	1,29 (0,57; 5,74)
Esp. rel. VE	0,39 ± 0,03	0,50 ± 0,07 *
Índice MVE (g/kg)	2,25 ± 0,21	2,85 ± 0,68 *
AE (mm)	5,06 ± 0,68	6,15 ± 1,15*
AE/AO	1,45 ± 0,19	1,73 ± 0,33 *
AE/PC (mm/kg)	17,3 ± 2,2	22,4 ± 4,6*

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; Índice 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, *p < 0,05. [#]: Dados expressos em mediana e valores mínimo e máximo, teste de Mann-Whitney.

Na Tabela 3 estão apresentados os dados ecocardiográficos dos grupos EAo, na 6ª semana, antes de receberem a dieta normolipídica (EAo-N) ou a dieta hiperlipídica (EAo-H). Não houve diferença estatística em nenhuma das variáveis analisadas.

Tabela 3. Dados ecocardiográficos dos grupos EAo-N e EAo-H na 6ª semana

Variáveis	Grupos	
	EAo-N (n=12)	EAo-H (n=12)
FC (bpm)	296 ± 34	304 ± 29
Fração ejeção	0,97 ± 0,02	0,97 ± 0,02
% Enc. Endo	71,4 ± 6,8	71,0 ± 6,8
VEPP (mm/s)	33,5 ± 6,1	34,2 ± 7,8
E/A [#]	1,08 (0,70; 5,74)	1,31 (0,57; 2,00)
Esp. rel. VE	0,52 ± 0,06	0,49 ± 0,09
Índice MVE (g/kg)	2,82 ± 0,83	2,88 ± 0,52
AE (mm)	6,17 ± 0,90	5,83 ± 0,53
AE/AO	1,80 ± 0,41	1,66 ± 0,22
AE/PC (mm/kg)	21,5 ± 3,7	22,1 ± 3,5

EAo-N: grupo estenose aórtica supraavalar com dieta normolipídica; EAo-H: grupo estenose aórtica supraavalar 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; Índice 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 – Perfil nutricional

Os parâmetros de avaliação do perfil nutricional dos animais ao final do experimento estão apresentados na Tabela 4. Não houve diferença estatística no peso corporal final dos grupos, entretanto o ganho de peso foi significativamente menor no grupo EAo-N em relação ao Sham-N. A ingestão alimentar foi menor nos grupos Sham-H e EAo-H em relação aos grupos Sham-N e EAo-N, respectivamente. Calculando-se a ingestão calórica, o grupo EAo-H ingeriu menor quantidade de calorias que o grupo Sham-H. A eficiência alimentar foi menor nos grupos Sham-N e EAo-N vs Sham-H e EAo-H, respectivamente. A gordura corporal total e o índice de adiposidade foram maiores no grupo EAo-H em relação ao grupo EAo-N. Os níveis de triacilglicerol e glicemia não foram diferentes entre os grupos, e os ácidos graxos

livres não-esterificados estão diminuídos no grupo EAo-N em relação ao grupo Sham-N.

Tabela 4. Perfil nutricional dos animais

Variável	Grupo	Dieta		Valor p
		Normo (n=12)	Hiper (n=12)	
Peso corporal final (g)	Sham	447 ± 45	464 ± 75	p > 0,05
	EAo	405 ± 46	422 ± 30	p > 0,05
<i>Valor p</i>		p > 0,05	p > 0,05	
Ganho de peso (g)	Sham	382 ± 49	393 ± 77	p > 0,05
	EAo	336 ± 47	352 ± 28	p > 0,05
<i>Valor p</i>		p < 0,05	p > 0,05	
Ingestão alimentar (g/dia)	Sham	29,1 ± 3,8	22,9 ± 3,5	p < 0,01
	EAo	27,2 ± 3,3	20,4 ± 2,2	p < 0,01
<i>Valor p</i>		p > 0,05	p > 0,05	
Ingestão calórica (kcal/dia)	Sham	85,2 ± 11,2	83,4 ± 12,9	p > 0,05
	EAo	79,8 ± 9,7	74,4 ± 7,9	p > 0,05
<i>Valor p</i>		p > 0,05	p < 0,05	
Eficiência alimentar (%)	Sham	2,07 ± 0,38	2,49 ± 0,51	p < 0,05
	EAo	1,95 ± 0,42	2,66 ± 0,31	p < 0,01
<i>Valor p</i>		p > 0,05	p > 0,05	
Gordura corporal total (g)	Sham	20,7 ± 7,7	26,6 ± 12,9	p > 0,05
	EAo	16,1 ± 8,2	23,7 ± 4,6	p < 0,05
<i>Valor p</i>		p > 0,05	p > 0,05	
Índice de adiposidade	Sham	4,60 ± 1,51	5,57 ± 1,97	p > 0,05
	EAo	3,88 ± 1,63	5,64 ± 1,05	p < 0,01
<i>Valor p</i>		p > 0,05	p > 0,05	
Glicemia (mg/dL)	Sham	91 ± 7	98 ± 15	p > 0,05
	EAo	90 ± 9	92 ± 11	p > 0,05
<i>Valor p</i>		p > 0,05	p > 0,05	
Triacilglicerol (mg/dL)	Sham	47,0 ± 16,4	48,3 ± 15,6	p > 0,05
	EAo	39,3 ± 14,6	49,7 ± 12,7	p > 0,05
<i>Valor p</i>		p > 0,05	p > 0,05	
Ácidos graxos livres não-esterificados (mmol/L)	Sham	0,38 ± 0,13	0,34 ± 0,05	p > 0,05
	EAo	0,30 ± 0,07	0,34 ± 0,08	p > 0,05
<i>Valor p</i>		p < 0,05	p > 0,05	

Sham: grupo controle; EAo: grupo estenose aórtica supra-avalvar; Normo: dieta normolipídica; Hiper: dieta hiperlipídica. Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni, p<0,05.

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

A Tabela 5 mostra a porcentagem de umidade em fragmentos dos ventrículos esquerdo e direito, do pulmão e do fígado nos grupos Sham-N, Sham-H, EAo-N e EAo-H. Não houve diferença estatística entre os grupos, mostrando que os animais com EAo não apresentam retenção hídrica, ou seja, sinais de insuficiência cardíaca.

Tabela 5. Porcentagem (%) de umidade nos tecidos

Variável	Grupo	Dieta		Valor p
		Normo (n=12)	Hiper (n=12)	
VE	Sham	75,2 (52,4; 85,2)	74,1 (70,1; 77,4)	p > 0,05
	EAo	75,9 (73,0; 81,4)	76,2 (73,8; 80,3)	p > 0,05
Valor p		p > 0,05	p > 0,05	
VD	Sham	75,9 (70,1; 85,9)	75,2 (72,1; 79,1)	p > 0,05
	EAo	76,0 (74,6; 77,8)	76,5 (74,7; 77,5)	p > 0,05
Valor p		p > 0,05	p > 0,05	
AT*	Sham	77,1 ± 2,5	77,7 ± 2,2	p > 0,05
	EAo	77,8 ± 1,4	77,0 ± 2,1	p > 0,05
Valor p		p > 0,05	p > 0,05	
Pulmão	Sham	67,6 (66,1; 70,5)	66,1 (62,7; 69,4)	p > 0,05
	EAo	67,4 (66,2; 69,1)	66,7 (65,5; 77,4)	p > 0,05
Valor p		p > 0,05	p > 0,05	
Fígado	Sham	78,7 (68,4; 82,2)	78,7 (63,3; 88,1)	p > 0,05
	EAo	78,9 (75,3; 80,2)	79,2 (77,4; 85,6)	p > 0,05
Valor p		p > 0,05	p > 0,05	

Sham: grupo controle; EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Normo: dieta normolipídica; Hiper: dieta hiperlipídica; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrio. Dados expressos em mediana e valores mínimo e máximo. Kruskal-Wallis complementado com Dunn, p<0,05. *Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni, p<0,05.

3.4 – Caracterização da remodelação cardíaca na 18ª semana

3.4.1 – Quantificação das enzimas reguladoras do metabolismo energético

Na Tabela 6 estão apresentados os dados do metabolismo energético miocárdico dos grupos Sham-N, EAo-N, Sham-H e EAo-H. A atividade da enzima ATP sintetase mostrou-se aumentada nos grupos EAo-N e EAo-H vs seus

respectivos controles, Sham-N e Sham-H; sendo que, o grupo Sham-H apresentou maior atividade dessa enzima em relação ao grupo Sham-N.

Tabela 6. Metabolismo energético cardíaco

Variável	Grupo	Dieta		Valor p
		Normo (n=6)	Hiper (n=6)	
Fosfofrutoquinase (nmol/g tecido)	Sham	223,3 ± 28,8	192,0 ± 28,5	p > 0,05
	EAO	200,3 ± 36,8	168,2 ± 50,7	p > 0,05
<i>Valor p</i>		p > 0,05	p > 0,05	
PDH (nmol/g tecido)	Sham	256,2 ± 14,5	194,5 ± 39,4	p > 0,05
	EAO	244,1 ± 103,1	218,1 ± 91,4	p > 0,05
<i>Valor p</i>		p > 0,05	p > 0,05	
OHADH (nmol/mg tecido)	Sham	0,21 ± 0,02	0,24 ± 0,10	p > 0,05
	EAO	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,01	p > 0,05
<i>Valor p</i>		p > 0,05	p > 0,05	
Citrato sintase (nmol/mg tecido)	Sham	0,51 ± 0,22	0,45 ± 0,15	p > 0,05
	EAO	0,33 ± 0,12	0,33 ± 0,06	p > 0,05
<i>Valor p</i>		p > 0,05	p > 0,05	
ATP sintetase (nmol/mg tecido)	Sham	56,9 ± 18,6	156,0 ± 65,7	p < 0,05
	EAO	310,1 ± 105,0	376,0 ± 90,3	p > 0,05
<i>Valor p</i>		p < 0,01	p < 0,01	

Sham: grupo controle; EAO: grupo estenose aórtica supraavalvar; Normo: dieta normolipídica; Hiper: dieta hiperlipídica; PDH: piruvato desidrogenase; OHADH: beta hidroxil CoA desidrogenase. Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni, p<0,05.

3.4.2 – Análise macroscópica do coração *post mortem*

A Tabela 7 mostra a estrutura macroscópica cardíaca *post mortem* dos grupos Sham-N, EAO-N, Sham-H e EAO-H. O peso do VE e do AT e as relações VE/tíbia e AT/tíbia foram maiores nos grupos EAO-N e EAO-H vs Sham-N e Sham-H, respectivamente. Adicionalmente, o peso do AT e a relação AT/tíbia foi menor no grupo EAO-H quando comparado ao grupo EAO-N. O grupo EAO-N apresentou menor comprimento da tíbia em comparação ao grupo Sham-N.

Tabela 7. Análise macroscópica cardíaca *post mortem*

Variável	Grupo	Dieta		Valor p
		Normo (n=12)	Hiper (n=12)	
VE (g)	Sham	0,81 ± 0,11	0,79 ± 0,09	p > 0,05
	E Ao	1,21 ± 0,18	1,14 ± 0,18	p > 0,05
Valor p		p < 0,01	p < 0,01	
VD (g)	Sham	0,28 ± 0,07	0,23 ± 0,03	p > 0,05
	E Ao	0,29 ± 0,10	0,27 ± 0,03	p > 0,05
Valor p		p > 0,05	p > 0,05	
AT (g)	Sham	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,02	p > 0,05
	E Ao	0,21 ± 0,10	0,16 ± 0,04	p < 0,05
Valor p		p < 0,01	p < 0,01	
Tíbia (cm)	Sham	4,27 ± 0,09	4,25 ± 0,12	p > 0,05
	E Ao	4,18 ± 0,07	4,20 ± 0,10	p > 0,05
Valor p		p < 0,05	p > 0,05	
VE/tíbia (g/cm)	Sham	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,02	p > 0,05
	E Ao	0,29 ± 0,04	0,27 ± 0,04	p > 0,05
Valor p		p < 0,01	p < 0,01	
VD/tíbia (g/cm)	Sham	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,01	p > 0,05
	E Ao	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,01	p > 0,05
Valor p		p > 0,05	p > 0,05	
AT/tíbia (g/cm)	Sham	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,005	p > 0,05
	E Ao	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01	p < 0,05
Valor p		p < 0,01	p < 0,05	

Sham: grupo controle; E Ao: grupo estenose aórtica supravalvar; Normo: dieta normolipídica; Hiper: dieta hiperlipídica; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso do átrio; 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 do átrio pela tíbia. Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni, p<0,05.

3.4.3 – Análise estrutural e funcional do coração por ecocardiograma

Os dados ecocardiográficos dos grupos na 18ª semana estão apresentados na Tabela 8. Os grupos E Ao-N e E Ao-H apresentaram fração de ejeção, %Enc. Endo, Esp. rel. VE, índice MVE, AE e AE/PC aumentados em comparação aos grupos Sham-N e Sham-H, respectivamente. A relação AE/AO foi maior no grupo E Ao-N vs Sham-N. A relação AE/PC foi maior no grupo E Ao-N vs E Ao-H. O diâmetro do AE (p=0,10) e a relação AE/AO (p<0,06) foi maior no grupo E Ao-N vs E Ao-H.

Tabela 8. Dados ecocardiográficos dos grupos na 18ª semana

Variável	Grupo	Dieta		Valor p
		Normo (n=12)	Hiper (n=12)	
FC (bpm)	Sham	296 ± 60	305 ± 37	p > 0,05
	EAO	276 ± 30	287 ± 45	p > 0,05
Valor p		p > 0,05	p > 0,05	
Fração ejeção [#]	Sham	0,91 (0,81; 0,96)	0,91 (0,88; 0,94)	p > 0,05
	EAO	0,99 (0,79; 0,99)	0,98 (0,89; 1,00)	p > 0,05
Valor p		p < 0,01	p < 0,01	
% Enc. Endo	Sham	56,0 ± 6,6	55,9 ± 3,1	p > 0,05
	EAO	72,1 ± 10,8	68,7 ± 9,7	p > 0,05
Valor p		p < 0,01	p < 0,01	
VEPP (mm/s)	Sham	40,9 ± 6,9	36,6 ± 5,4	p > 0,05
	EAO	36,8 ± 8,0	38,2 ± 6,4	p > 0,05
Valor p		p > 0,05	p > 0,05	
E/A [#]	Sham	1,47 (0,72; 2,50)	1,71 (1,14; 2,02)	p > 0,05
	EAO	1,45 (0,75; 9,39)	1,45 (0,56; 2,00)	p > 0,05
Valor p		p > 0,05	p > 0,05	
Esp. rel. VE	Sham	0,37 ± 0,02	0,39 ± 0,04	p > 0,05
	EAO	0,56 ± 0,06	0,58 ± 0,08	p > 0,05
Valor p		p < 0,01	p < 0,01	
Índice MVE (g/kg)	Sham	1,74 ± 0,22	1,58 ± 0,19	p > 0,05
	EAO	2,87 ± 0,67	2,53 ± 0,52	p > 0,05
Valor p		p < 0,01	p < 0,01	
AE (mm)	Sham	4,99 ± 0,59	5,29 ± 0,54	p > 0,05
	EAO	6,90 ± 1,44	6,26 ± 0,88	p > 0,05
Valor p		p < 0,01	p < 0,05	
AE/AO	Sham	1,28 ± 0,14	1,36 ± 0,18	p > 0,05
	EAO	1,77 ± 0,42	1,57 ± 0,26	p > 0,05
Valor p		p < 0,01	p > 0,05	
AE/PC (mm/kg)	Sham	10,9 ± 1,2	11,5 ± 2,1	p > 0,05
	EAO	16,5 ± 3,8	14,4 ± 1,8	p < 0,05
Valor p		p < 0,01	p < 0,01	

Sham: grupo controle; EAO: grupo estenose aórtica supravalvar; Normo: dieta normolipídica; Hiper: 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; 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 expressos em média ± desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni, p<0,05. [#]: Dados expressos em mediana e valores mínimo e máximo. Kruskal-Wallis complementado com Dunn, p<0,05.

3.4.4 – Análise das isoformas de cadeia pesada de miosina (MyHC)

A razão β/α MyHC dos grupos está apresentada em unidade arbitrária na Tabela 9. Os animais EAo-N e EAo-H apresentaram maior razão β/α MyHC em relação aos animais Sham-N e Sham-H, respectivamente.

Tabela 9. Razão β/α das isoformas de cadeia pesada de miosina (MyHC)

Variável	Grupo	Dieta		Valor p
		Normo (n=6)	Hiper (n=6)	
β/α MyHC	Sham	1,01 \pm 0,01	0,99 \pm 0,03	p > 0,05
	EAo	1,07 \pm 0,01	1,05 \pm 0,03	p > 0,05
Valor p		p < 0,01	p < 0,01	

Sham: grupo controle; EAo: grupo estenose aórtica supravalvar; Normo: dieta normolipídica; Hiper: dieta hiperlipídica. Dados expressos em média \pm desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni, p<0,05.

3.4.5 – Expressão das proteínas do trânsito de cálcio

As expressões das proteínas SERCA2a, PLB, pPLB Ser16 e pPLB Thr17 e as relações SERCA2a/PLB, pPLBSer16/PLB e pPLBThr17/PLB estão apresentadas em unidades arbitrárias nas Figuras 2-8.

Os grupos EAo-N e EAo-H apresentaram menor expressão da SERCA2a quando comparados aos grupos Sham-N e Sham-H, respectivamente (Figura 2).

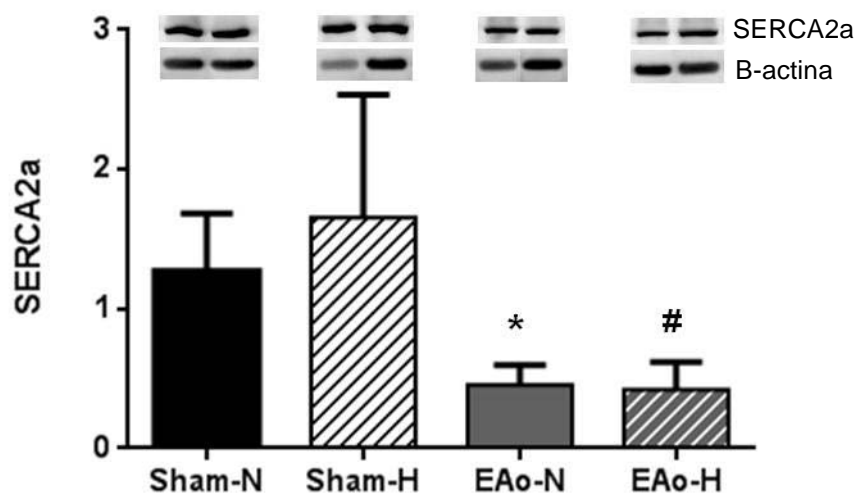


Figura 2. Sham-N (n=6): grupo controle com dieta normolipídica; Sham-H (n=6): grupo controle com dieta hiperlipídica; EAo-N (n=6): grupo estenose aórtica supravalvar com dieta normolipídica; EAo-H (n=6): grupo estenose aórtica supravalvar com dieta hiperlipídica. Dados expressos em média \pm desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni. * $p < 0,05$ EAo-N x Sham-N; # $p < 0,01$ EAo-H x Sham-H.

3). Não houve diferença estatística na expressão da PLB entre os grupos (Figura

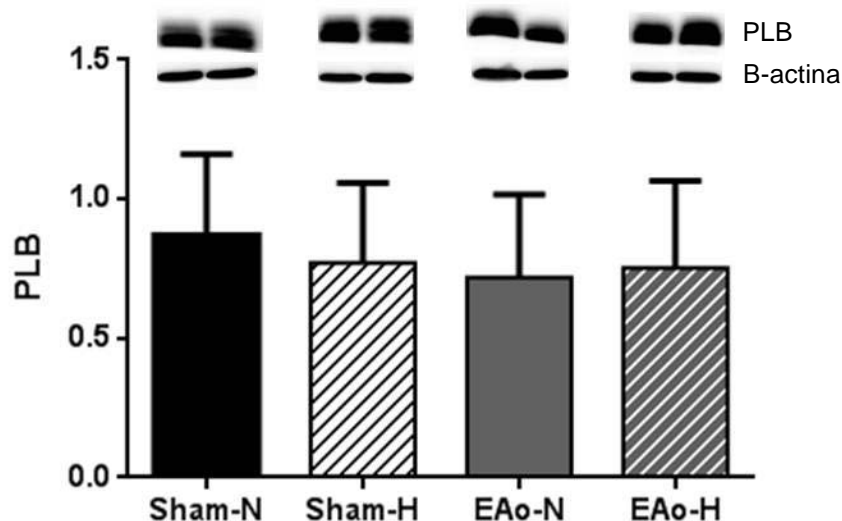


Figura 3. Sham-N (n=6): grupo controle com dieta normolipídica; Sham-H (n=6): grupo controle com dieta hiperlipídica; EAo-N (n=6): grupo estenose aórtica supravalvar com dieta normolipídica; EAo-H (n=6): grupo estenose aórtica supravalvar com dieta hiperlipídica. Dados expressos em média \pm desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Os animais do grupo EAo-N apresentaram maior expressão de pPLB Ser16 em relação aos grupos Sham-N e EAo-H (Figura 4).

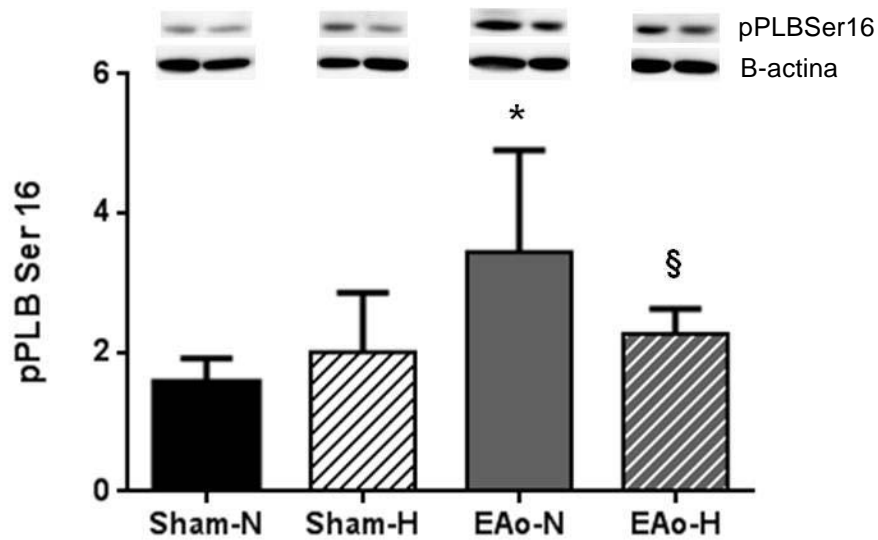


Figura 4. Sham-N (n=6): grupo controle com dieta normolipídica; Sham-H (n=6): grupo controle com dieta hiperlipídica; EAo-N (n=6): grupo estenose aórtica supra-avalvar com dieta normolipídica; EAo-H (n=6): grupo estenose aórtica supra-avalvar com dieta hiperlipídica. Dados expressos em média \pm desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni. * $p < 0,01$ EAo-N x Sham-N; § $p < 0,05$ EAo-H x EAo-N.

Não houve diferença estatística na expressão da pPLB Thr17 entre os grupos (Figura 5).

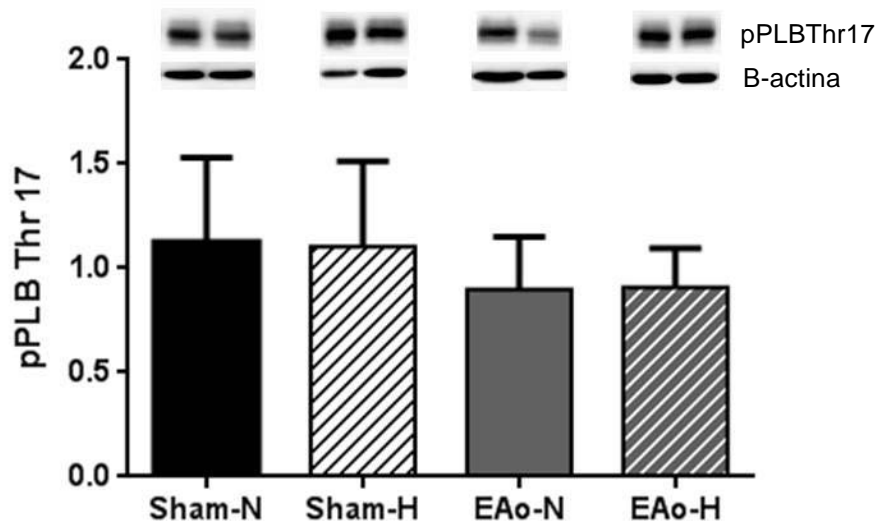


Figura 5. Sham-N (n=6): grupo controle com dieta normolipídica; Sham-H (n=6): grupo controle com dieta hiperlipídica; EAo-N (n=6): grupo estenose aórtica supra-avalvar com dieta normolipídica; EAo-H (n=6): grupo estenose aórtica supra-avalvar com dieta hiperlipídica. Dados expressos em média \pm desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni. Não houve diferença estatística entre os grupos.

A relação SERCA2a/PLB foi menor nos grupos EAo-N e EAo-H vs Sham-N e Sham-H, respectivamente (Figura 6). O grupo Sham-H apresentou maior relação SERCA2a/PLB em comparação ao Sham-N.

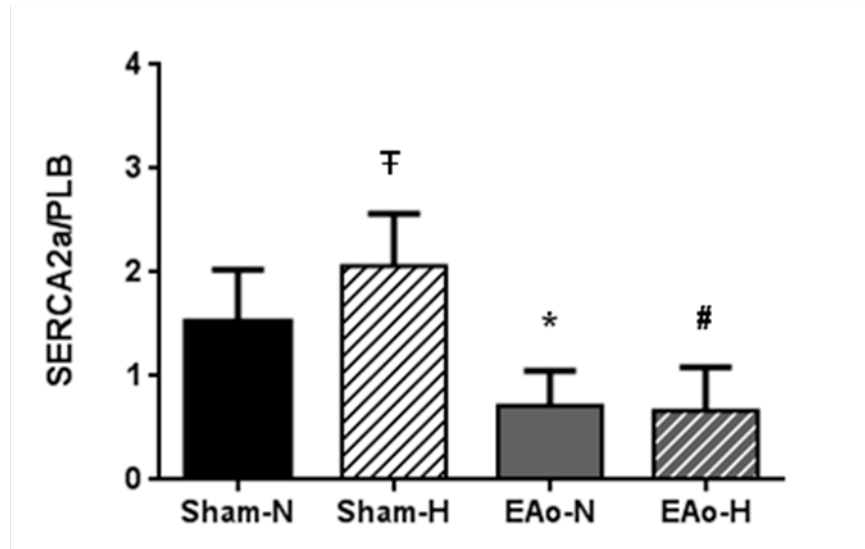


Figura 6. Sham-N (n=6): grupo controle com dieta normolipídica; Sham-H (n=6): grupo controle com dieta hiperlipídica; EAo-N (n=6): grupo estenose aórtica supravalvar com dieta normolipídica; EAo-H (n=6): grupo estenose aórtica supravalvar com dieta hiperlipídica. Dados expressos em média \pm desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni. † $p < 0,05$ Sham-H x Sham-N; * $p < 0,01$ EAo-N x Sham-N; # $p < 0,01$ EAo-H x Sham-H.

A relação pPLB Ser16/PLB foi maior no grupo EAo-N em relação aos grupos Sham-N e EAo-H (Figura 7).

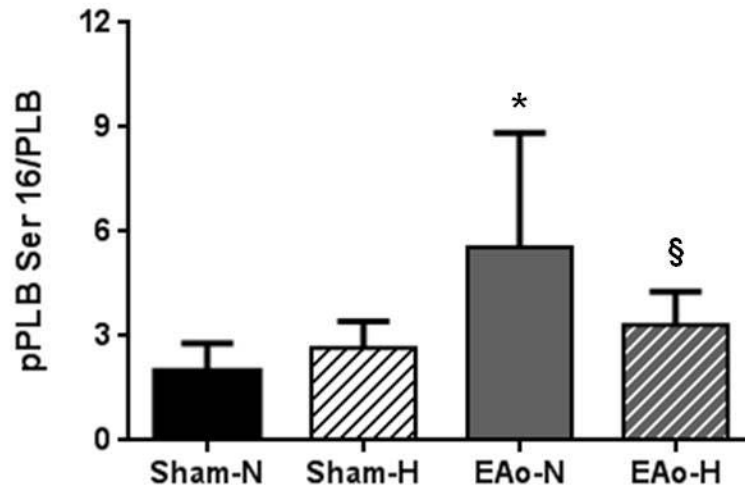


Figura 7. Sham-N (n=6): grupo controle com dieta normolipídica; Sham-H (n=6): grupo controle com dieta hiperlipídica; EAo-N (n=6): grupo estenose aórtica supravalvar com dieta normolipídica; EAo-H (n=6): grupo estenose aórtica supravalvar com dieta hiperlipídica. Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA complementada com Bonferroni. * $p < 0,01$ EAo-N x Sham-N; § $p < 0,05$ EAo-H x EAo-N.

A relação pPLB Thr17/PLB não foi diferente entre os grupos (Figura 8).

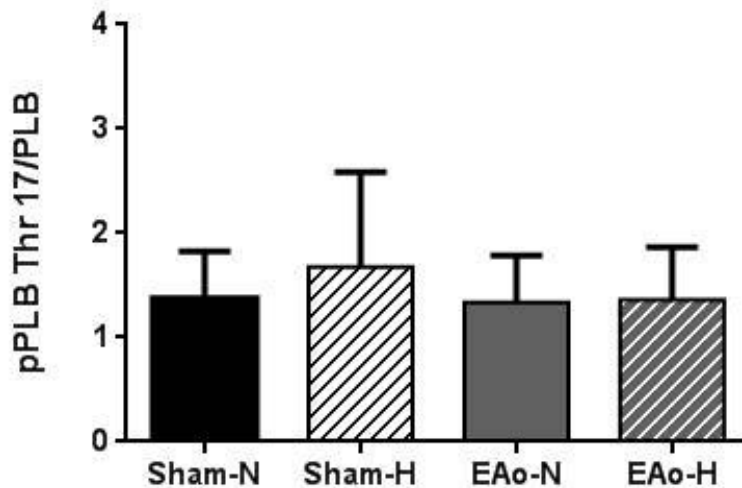


Figura 8. Sham-N (n=6): grupo controle com dieta normolipídica; Sham-H (n=6): grupo controle com dieta hiperlipídica; EAo-N (n=6): grupo estenose aórtica supravalvar com dieta normolipídica; EAo-H (n=6): grupo estenose aórtica supravalvar com dieta hiperlipídica. Dados expressos em média ± desvio padrão ANOVA complementada com Bonferroni. Não houve diferença estatística entre os grupos.

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

4.1 – Dietas hiperlipídicas

Mundialmente, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com a utilização de dietas manipuladas de acordo com o tratamento de interesse⁽⁶²⁻⁷¹⁾. O desenvolvimento de dietas é resultante da alteração na quantidade ou no tipo dos ingredientes e/ou resultante da adição de fármacos. Inúmeros pesquisadores alteram suas dietas por simples adição do composto de interesse; entretanto, a adição de um componente, em grande quantidade, é acompanhada de diluição dos demais compostos da dieta, o que poderá comprometer as conclusões do estudo. Trabalhos anteriores, realizados em nosso laboratório, utilizando dietas hiperlipídicas para indução de obesidade em ratos, apresentavam diminuição nos níveis de carboidratos em relação à dieta normolipídica; como citado anteriormente, essa alteração poderia dificultar a conclusão do fator responsável pelos resultados observados nos estudos^(73,74,85). Esse mesmo viés metodológico é encontrado em trabalhos da literatura mundial⁽⁶²⁻⁷¹⁾. Com a finalidade de estudar apenas o efeito do aumento de lipídeos, foram desenvolvidas, no presente estudo, dietas normolipídica e hiperlipídica acompanhadas de equilíbrio nos níveis de carboidratos (Tabela 1). Essa formulação nos permite inferir que as alterações observadas foram decorrentes da influência da quantidade de gordura.

4.2 – Estrutura e função por ecocardiograma na 6ª semana

Como a proposta deste estudo é iniciar os tratamentos dietéticos em animais com EAo e alterações de estrutura e função cardíacas, tornou-se necessária a avaliação *in vivo* desses ratos na 6ª semana para comprovar se a EAo promoveu RC.

Os dados ecocardiográficos (Tabela 2) mostraram que a EAo levou à alteração estrutural do tipo hipertrofia concêntrica e ao aumento do diâmetro absoluto e relativo do átrio esquerdo. Os animais EAo apresentaram melhoria da função sistólica visualizada pela fração de ejeção e % enc. endo. Embora a relação E/A, indicadora de função diastólica, tenha sido semelhante entre os grupos, o aumento do AE acompanhado de melhoria na função sistólica sugere que a alteração atrial foi consequente à disfunção diastólica ventricular. Os dados estruturais e a análise dos parâmetros relacionados com a função sistólica estão de acordo com dados de diversos autores^(2,14,15,24,25). O comportamento da relação E/A neste estudo foi semelhante a Ribeiro *et al*⁽²⁵⁾, Gonçalves *et al*⁽¹⁴⁾ e Bregagnollo *et al*⁽¹⁵⁾, mas diferiu dos estudos citados anteriormente, onde se observou que essa variável foi menor⁽²⁾ ou maior⁽²⁴⁾ nos animais EAo com 6 semanas. A divergência nos dados dessa variável pode ser atribuída a diferenças na frequência cardíaca desses animais, dificultando a mensuração da função diastólica.

4.3 – Perfil nutricional dos animais na 18ª semana

Desde que este trabalho teve como finalidade utilizar uma dieta hiperlipídica que poderia alterar a função cardíaca, o perfil nutricional (Tabela 4) dos animais foi analisado ao término do período experimental de 18 semanas. Embora a ingestão alimentar tivesse sido menor no grupo EAo-H vs EAo-N e a ingestão calórica semelhante nos dois grupos, o índice de adiposidade foi maior no grupo EAo-H vs EAo-N. A taxa de gordura é dependente do equilíbrio entre o consumo de alimentos e o gasto energético. O aumento da gordura corporal dos animais EAo-H pode ser explicado pelo efeito térmico dos alimentos, visto que os lipídeos necessitam de baixa quantidade de energia, 2-3%, para serem metabolizados; portanto, os lipídeos que não são necessários na produção de energia são depositados na forma de

triglicérides nos adipócitos. A comparação do índice de adiposidade nos grupos Sham mostra que esses animais não tiveram o mesmo comportamento dos ratos EAo, porque os Sham não tiveram aumento significativo do índice de adiposidade com a dieta hiperlipídica. Não encontramos dados na literatura que utilizaram metodologia similar. A análise do perfil lipídico e glicêmico mostrou que o tratamento dietético do grupo EAo não alterou essas variáveis; esse comportamento pode ser decorrente do curto período de exposição à dieta hiperlipídica. Outras variáveis indicadoras de comorbidades associadas ao aumento da adiposidade precisam ser analisadas, como leptina, insulina, resistência à insulina, teste de tolerância à glicose e pressão arterial sistêmica.

4.4 – Remodelação cardíaca na 18ª semana

4.4.1 – Metabolismo energético miocárdico

O tratamento com a dieta hiperlipídica teve como finalidade aumentar o metabolismo energético por meio de uma maior utilização dos ácidos graxos. Para isso, foi necessário analisar o metabolismo energético cardíaco da glicose e dos ácidos graxos. A análise das enzimas reguladoras do metabolismo energético cardíaco mostrou que a dieta hiperlipídica não acarretou alteração da via glicolítica, tanto anaeróbica quanto aeróbica, nem da via beta oxidativa evidenciada pelas enzimas PFK, PDH, CS e OHADH entre os grupos (Tabela 6). Portanto, não ocorreu a alteração proposta no estudo, ou seja, o aumento da beta oxidação em detrimento da via glicolítica nos ratos com sobrecarga pressórica. Os resultados obtidos neste estudo dificultam a comparação com os trabalhos da literatura em virtude dos autores utilizarem diferentes modelos experimentais, composição das dietas, momentos de tratamento e variáveis analisadas^(62,64,68,69,71). Dentro desses estudos, podemos comparar apenas a enzima CS do ciclo de Krebs e a MCAD da beta

oxidação, nas quais os autores verificaram melhora^(62,64,71) ou não alteração^(68,69) da sua atividade nos grupos patológicos tratados com dietas hiperlipídicas.

Observou-se, neste projeto, um resultado interessante em relação à atividade da ATP sintetase, enzima da última etapa da fosforilação oxidativa, responsável pela síntese de ATP. Essa enzima mostrou-se elevada nos grupos EAo em comparação aos animais Sham; o efeito da dieta hiperlipídica foi visualizado apenas entre os animais Sham, não ocorrendo diferença entre os EAo. Acreditamos que o aumento da atividade da ATP sintetase nos grupos EAo em relação aos Sham se deva à necessidade de maior produção de ATP, visto que esses animais apresentam maior crescimento celular e, conseqüentemente, alta demanda energética nesse modelo de agressão cardíaca. No grupo EAo-H em comparação ao grupo EAo-N, não ocorreu aumento da ATP sintetase provavelmente porque esses animais estariam trabalhando na sua capacidade máxima de produção. Apesar de não ter havido diferença na atividade das enzimas das vias glicolítica e beta oxidativa, o aumento da ATP sintetase nos animais EAo sugere maior eficiência dessa enzima, desde que a mesma utiliza o ADP proveniente da quebra do ATP para resintetizar esse nucleotídeo.

4.4.2 – Macroscopia cardíaca *post mortem*

A análise macroscópica cardíaca *post mortem* na 18ª semana (Tabela 7) permite avaliar com segurança as alterações estruturais; o resultado dessa avaliação mostrou hipertrofia ventricular esquerda e atrial nos animais com EAo comprovando os achados obtidos na 6ª semana pelo ecocardiograma. O modelo de estenose aórtica supra-avalvar expõe o VE à sobrecarga de pressão prolongada levando-o à hipertrofia concêntrica como um mecanismo compensatório para preservar a função sistólica. Inicialmente, a hipertrofia consegue contrabalancear o aumento da tensão

sistólica da parede do VE; entretanto, se esse processo continua, a RC acarreta deterioração da função do coração. O estímulo para essa remodelação cardíaca ocorre por fatores mecânicos e bioquímicos que agem nos receptores, canais iônicos e integrinas presentes na membrana sarcolemal, sinalizadores bioquímicos citosólicos que desencadeiam aumentada síntese de proteínas e alterações na expressão gênica ^(5,26). Os resultados estão de acordo com trabalhos publicados anteriormente por nosso grupo ^(2,16,17,25). O tratamento com a dieta hiperlipídica não acarretou alteração na remodelação ventricular no grupo EAo; entretanto, a administração dietética atenuou significativamente a hipertrofia atrial evidenciada pelo peso dos átrios em valor absoluto e relativo. Como a hipertrofia está relacionada com aumento de tensão parietal ^(2,30,89), podemos inferir que deve ter ocorrido diminuição na tensão parietal atrial, conseqüente à diminuição da pressão diastólica final do VE.

4.4.3 – Estrutura e função por ecocardiograma

A avaliação morfológica e funcional cardíaca *in vivo* na 18ª semana (Tabela 8) foi realizada com auxílio do ecocardiograma. Este estudo mostrou que os animais EAo apresentaram alteração estrutural visualizada pelo aumento da esp. rel. VE, índice MVE, AE e AE/PC, e alteração funcional demonstrada pela elevação da fração de ejeção e % Enc. Endo, em relação aos Sham; esses achados estão de acordo com outros autores ^(2,24). Constatou-se neste estudo que a dieta hiperlipídica atenuou o processo hipertrófico atrial nos animais EAo evidenciado pela queda significativa na relação AE/PC. Outras variáveis que analisaram o comportamento do átrio esquerdo, tais como o seu diâmetro e sua relação com o diâmetro da aorta, mostraram também tendência à redução, AE (p=0,10) e AE/AO (p<0,06). Portanto,

os dados ecocardiográficos indicam que a dieta hiperlipídica acarretou redução no diâmetro do átrio esquerdo. Os animais EAo-N e EAo-H apresentaram função sistólica melhor que os animais de ambos os grupos Sham; além disso, a dieta hiperlipídica não alterou o desempenho sistólico entre os grupos EAo. Devido a esses resultados, provavelmente a redução do AE no grupo EAo-H deve ter sido consequente à melhoria na distensibilidade do VE com redução da pressão diastólica final, o que impediu a progressão da disfunção diastólica nesses animais. Entretanto, se considerarmos o comportamento do AE na 6ª semana, quando inferimos que o aumento dessa variável foi devido à disfunção diastólica, mesmo sendo a relação E/A igual nos dois grupos, esse raciocínio pode explicar o aumento do AE no grupo EAo-N na 18ª semana. Como referido acima, esses animais apresentaram função sistólica superior aos Sham, levando-nos a crer que o aumento do AE foi sempre consequente da disfunção diastólica, que se exteriorizou na 6ª semana. Bregagnollo *et al* na 6ª semana constatou aumento da pressão diastólica final e manutenção da função sistólica do VE⁽¹⁵⁾. Estudos hemodinâmicos com a finalidade de medir a pressão diastólica final do VE, como realizado por Bregagnollo, devem ser realizados para comprovar essa hipótese.

4.4.4 – Isoformas de cadeia pesada de miosina (MyHC)

Na hipertrofia cardíaca por sobrecarga pressórica, ocorre alteração nas cadeias pesadas de miosina (MyHC) com redução das isoformas cardíacas do tipo rápida- α (V1) e aumento da lenta- β (V3)^(35,40,41). Os resultados obtidos neste experimento mostram que nos animais EAo ocorreu alteração das isoformas de miosina evidenciada pelo aumento da razão β/α MyHC em relação aos animais Sham, indicando que as miofibrilas do VE foram alteradas para um padrão de contração mais lenta para economizar energia. Esses achados estão de acordo com

a literatura^(34,35,40,41). A elevação da razão β/α MyHC nos animais EAo, que poderia acarretar disfunção sistólica, não ocorreu pois, de acordo com o ecocardiograma, a função sistólica apresentou-se melhorada. A dieta hiperlipídica não foi capaz de prevenir a elevação da isoforma lenta(β) MyHC como proposto inicialmente neste trabalho. Esse achado se opõe à hipótese inicial de que o aumento da oferta energética atenuaria a alteração nas isoformas de MyHC. Embora tivesse sido constatado elevação na atividade da ATP sintetase, o que significa maior síntese de ATP, não podemos inferir que esse aumento foi suficiente para atender às demandas energéticas do miocárdio hipertrofiado.

4.4.5 – Expressão das proteínas do trânsito de cálcio

Outra hipótese deste trabalho era de que a SERCA2a, responsável pela recaptura de cálcio do citosol para o RS, também uma ATPase como a MyHC, estaria diminuída nos animais EAo-N, mas a dieta hiperlipídica preveniria essa queda nos animais EAo-H. Entretanto, a dieta hiperlipídica não foi capaz de prevenir a alteração na expressão da SERCA2a. Como sua atividade é regulada pela PLB⁽⁹⁰⁾, foi avaliada a relação SERCA2a/PLB. Para verificar o estado de fosforilação da PLB foram analisadas as relações pPLBSer16/PLB e pPLBTh17/PLB, fosforiladas por proteína kinase A (PKA) e calmodulina quinase, respectivamente. Em concordância com a literatura, a relação SERCA2a/PLB mostrou-se diminuída nos grupos EAo^(29,36,38); esse comportamento é decorrente da diminuição da expressão da SERCA2a visto que a expressão da PLB não se alterou entre os grupos. Proteínas com alto peso molecular e com alta demanda energética, como a SERCA2a, necessitam de elevado consumo de energia para a síntese e manutenção do seu desempenho. Em situações patológicas, tal como a sobrecarga pressórica, onde há

utilização de muita energia e a produção de ATP pode estar em capacidade máxima, é lógico admitir que essas proteínas devam estar diminuídas para restringir o gasto.

Outro resultado interessante deste trabalho foi o comportamento da PLB fosforilada na Ser16, cuja fosforilação via sistema beta adrenérgico-PKA está aumentada no grupo EAo-N vs Sham-N. Se levarmos em consideração que os animais EAo com 18 semanas estão em fase de transição entre disfunção ventricular e desenvolvimento de insuficiência cardíaca, é esperado que o sistema beta adrenérgico esteja mais ativado, o que explicaria o aumento da fosforilação da pPLB Ser16; esse comportamento é um indicador indireto que os ratos com EAo apresentam aumento da atividade do sistema nervoso simpático. A dieta hiperlipídica atenuou, por mecanismos desconhecidos, a ativação do sistema beta adrenérgico na fosforilação da pPLB Ser16 no grupo EAo-H. A semelhança na expressão da pPLB Thr17 entre os grupos sugere que não houve ativação dessa via sinalizada pelo cálcio citosólico.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, a hipótese foi parcialmente confirmada; a dieta hiperlipídica atenuou a disfunção diastólica, evidenciada pela diminuição da hipertrofia atrial, e preservou a função sistólica no grupo EAo-H. Entretanto, nesse processo, não houve participação das proteínas com alta capacidade ATPásica, como a MyHC e a SERCA2a, sugerindo que a dieta hiperlipídica não acarretou aumento energético miocárdico.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

- 1) Cohn JN, Ferrarri R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 35: 562-82.
- 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: 62-70.
- 3) Opie LH. Heart failure: neurohumoral responses. In: Opie LH. *The Heart. Physiology from cell to circulation*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p. 485-524.
- 4) Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*. 2000; 102: 470-9.
- 5) Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. História natural da remodelação miocárdica: da agressão aos sintomas. *Rev Soc Cardiol 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 Estado de São Paulo*. 2002; 12: 371-8.
- 8) Okoshi MP, Matsubara LS, Franco M, Cicogna AC, Matsubara BB. Myocyte necrosis the basis for fibrosis in renovascular hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res*. 1997; 30: 1135-44.

- 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: 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: 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: 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: 1410-22.
- 13) Mestrinel MA. Avaliação morfológica, bioquímica e funcional do remodelamento cardíaco desencadeado por sobrecarga pressórica em ratos com e sem insuficiência cardíaca congestiva. [dissertação]. Botucatu: Faculdade Medicina, Universidade Estadual Paulista. 2003.
- 14) Gonçalves G, Zornoff LAM, Ribeiro HB, Okoshi MP, Cordaro FRS, Okoshi K, *et al.* O bloqueio do sistema renina-angiotensina atenua a remodelação cardíaca de ratos submetidos a estenose aórtica. *Arq Bras Cardiol.* 2005; 84: 304-8.
- 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: 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.* 2006; 113: 188-93.
- 17) Bregagnollo EA, Mestrinel MA, Okoshi K, Carvalho FC, Bregagnollo IF, Padovani CR, *et al.* Papel relativo da remodelação geométrica do ventrículo esquerdo, morfológica e funcional do miocárdio na transição da hipertrofia compensada para a falência cardíaca em ratos com estenose aórtica supravalvar. *Arq Bras Cardiol.* 2007; 88: 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: 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: 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: 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: 383-96.
- 22) Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Squire R, Okoshi MP, Bing OHL. Participação do estado contrátil e do relaxamento miocárdico na disfunção ventricular durante a transição hipertrofia-falência cardíaca. *Arq Bras Cardiol.* 1997; 69: 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: 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: 2642-54.
- 25) Ribeiro HB, Okoshi K, Cicogna AC, Bregagnollo EA, Rodrigues MAM, Padovani CR, *et al.* Estudo evolutivo da morfologia e função cardíaca em ratos submetidos a estenose aórtica supra-avalvar. *Arq Bras Cardiol*. 2003; 81: 562-8.
- 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: 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) McCall E, Ginsburg KS, Bassani RA, Shannon TR, Qi M, Samarel AM, *et al.* Ca flux, contractility, and excitation-contraction coupling in hypertrophied rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1998; 274: H1348-60.
- 29) Houser SR, Placinto V, Weisser J. Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2000; 32: 1595-607.
- 30) Opie LH. Myocardial contraction and relaxation. In: Opie LH. *The Heart. Physiology from cell to circulation*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p.209-31.
- 31) Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002; 415: 198-205.

- 32) Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 1983; 245: C1-14.
- 33) VanBuren P, Harris DE, Alpert NR, Warshaw DM. Cardiac V1 And V3 myosins differ in their hydrolytic and mechanical activities in vitro. *Circ Res.* 1995; 77: 439- 44.
- 34) Herron TD, Vandenboom R, Fomicheva E, Mundada L, Edwards T, Metzger JM. Calcium-independent negative inotropy by b-myosin heavy chain gene transfer in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2007; 100: 1182-90.
- 35) Gupta MP. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 43: 388-403.
- 36) Zarain-Herzberg A. Regulation of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase expression in the hypertrophied and failing heart. *Can Physiol Pharmacol.* 2006; 84: 509-21.
- 37) Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res.* 2005; 68: 366-75.
- 38) Ravens U, Dobrev D. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase and phospholamban in the failing and nonfailing heart. *Cardiovasc Res.* 2000; 45: 245-52.
- 39) Müller OJ, Lange M, Rattunde H, Lorenzen HP, Müller M, Frey N, *et al.* Transgenic rat hearts overexpressing SERCA2a show improved contractility under baseline conditions and pressure overload. *Cardiovasc Res.* 2003; 59: 380-9.
- 40) Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999; 79: 215-62.

- 41) 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: 191-227.
- 42) Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CDL, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev.* 2010; 90: 207-58.
- 43) Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev.* 2005; 85: 1093-129.
- 44) 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: 246-53.
- 45) Sambandam N, Lopaschuk GD. AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart. *Prog Lipid Res.* 2003; 42: 238-56.
- 46) Okoshi K, Guimaraes JF, Di Muzio BP, Fernandes AA, Okoshi MP. Miocardiopatia diabética. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007; 51: 160-7.
- 47) An D, Rodrigues B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291: 1489-506.
- 48) Augustus AS, Kako Y, Yagyu H, Goldberg IJ. Routes of FA delivery to cardiac muscle: modulation of lipoprotein lipolysis alters uptake of TG-derived FA. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 284: 331-9.
- 49) Teusink B, Voshol PJ, Dahlmans VE, Rensen PC, Pijl H, Romijn JA, *et al.* Contribution of fatty acids released from lipolysis of plasma triglycerides to total plasma fatty acid flux and tissue-specific fatty acid uptake. *Diabetes.* 2003; 52: 614-20.

- 50) Depre C, Vanoverschelde JL, Taegtmeyer H. Glucose for the heart. *Circulation*. 1999; 99(4): 578-88.
- 51) Lopaschuk GD, Folmes CD, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res*. 2007; 101: 335-47.
- 52) Nuutila P, Koivisto VA, Knutti J, Routsalainen U, Teras M, Haaparanta M, *et al*. Glucose-free fatty acid cycle operates in human heart and skeletal muscle in vivo. *J Clin Invest*. 1992; 89: 1767-74.
- 53) Peterson LR, Herrero P, Schechtman KB, Racette SB, Waggoner AD, Kisrieva-Ware Z, *et al*. Effect of obesity and insulin resistance on myocardial substrate metabolism and efficiency in young women. *Circulation*. 2004; 109: 2191-6.
- 54) Koustsari C, Jensen MD. Thematic review series: patient-oriented research. Free fatty acid metabolism in human obesity. *J Lipid Res*. 2006; 47: 1643-50.
- 55) Szczepaniak LS, Dobbins RL, Metzger GJ, Sartoni-D'Ambrosia G, Arbique D, Vongpatanasin W, *et al*. Myocardial triglycerides and systolic function in humans: in vivo evaluation by localized proton spectroscopy and cardiac imaging. *Magn Reson Med*. 2003; 49: 417-23.
- 56) Mazumder PK, O'Neill BT, Roberts MW, Buchanan J, Yun UJ, Cooksey RC, *et al*. Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes*. 2004; 53: 2366-74.
- 57) Allard MF. Energy substrate metabolism in cardiac hypertrophy. *Curr Hypertens Rep*. 2004, 6: 430-5.
- 58) Sambandam N, Lopaschuk GD, Brownsey RW, Allard MF. Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail Rev*. 2002; 7: 161-73.
- 59) Nascimben L, Ingwall JS, Lorell BH, Pinz I, Schultz V, Tornheim K, *et al*. Mechanisms for increased glycolysis in the hypertrophied rat heart. *Hypertension*.

2004; 44: 662-7.

60) Jameel MN, Zhang J. Myocardial energetics in left ventricular hypertrophy. *Curr Cardiol Rev.* 2009; 5: 243-50.

61) Chess DJ, Stanley WC. Role of diet and fuel overabundance in the development and progression of heart failure. *Cardiovasc Res.* 2008; 79: 269-78.

62) 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 Cardiac Fail.* 2008; 14: 82-8.

63) 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: 1808-13.

64) Chess DJ, Khairallah RJ, O'Shea KM, Xu W, Stanley WC. A high-fat diet increases adiposity but maintains mitochondrial oxidative enzymes without affecting development of heart failure with pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 297: H1585-93.

65) 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: 457-67.

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

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

- 68) 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 Cardiac Fail.* 2008; 14: 327-35.
- 69) Duda MK, O'Shea KM, Lei B, Barrows BR, Azimzadeh AM, McElfresh TA, *et al.* Dietary supplementation with w-3 PUFA increases adiponectin and attenuates ventricular remodeling and dysfunction with pressure overload. *Cardiovasc Res.* 2007; 76: 303-10.
- 70) 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 Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291: 38-44.
- 71) Okere IC, Young ME, McElfresh TA, Chess DJ, Sharov VG, Sabbah HN, *et al.* Low carbohydrate/high-fat diet attenuates cardiac hypertrophy, remodeling, and altered gene expression in hypertension. *Hypertension.* 2006; 48: 1116-23.
- 72) Boluyt MO, Robinson KG, Meredith AL, Sem S, Lakatta EG, Crow MT, *et al.* Heart failure after long-term supraaortic constriction in rats. *Am J Hypertens.* 2005; 18: 202-12.
- 73) 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: 968-74.
- 74) 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: 615-20.

- 75) Boustany CM, Bharadwoj K, Dougherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. AT1-receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Com Physiol*. 2005; 289: 181-6.
- 76) Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebekk A. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol*. 2000; 89: 1445-54.
- 77) 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: H1534-9.
- 78) 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: 109-17.
- 79) Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman HA, Peterson KL, Gottshall KR, *et al*. Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation*. 1996; 94: 1109-17.
- 80) Cantor EJJ, 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 Cell Cardiol*. 2005; 38: 777-86.
- 81) Paiva SA, Zornoff LA, 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: 2242-6.
- 82) 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: 230-4.
- 83) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;

72: 248-54.

84) Reiser PJ, Kline WO. Electrophoretic separation and quantitation of cardiac myosin heavy chain isoforms in eight mammalian species. *Am J Physiol.* 1998; 274: 1048-53.

85) Oliveira Jr 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: BR208-17.

86) Rolim NP, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, *et al.* Exercise training improves the net balance of cardiac Ca^{2+} handling protein expression in heart failure. *Physiol Genomics.* 2007; 29: 246-52.

87) De Tomasi LC, Bruno A, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Oliveira Jr SA, *et al.* Food restriction promotes downregulation of myocardial L-type Ca^{2+} channels. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009; 87: 426-31.

88) Johnson RA, Wichern DW. Applied multivariate statistical analysis. New Jersey; Prentice-Hall. 1998; 4: 816.

89) Katz AM. Active state, length-tension relationship, and cardiac mechanics. In: Katz AM. *Physiology of the heart.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 140-61.

90) Deus AF, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Alves CAB, Mazeto CFS, Silva DCT, *et al.* Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA) e bomba de cálcio da membrana plasmática (PMCA). In: Resende RR, Leite MF, Guatimosim S, eds. *Sinalização de Cálcio: Bioquímica e Fisiologia Celulares.* 1^a ed. São Paulo: Sarvier; 2012. p. 213-37.